



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

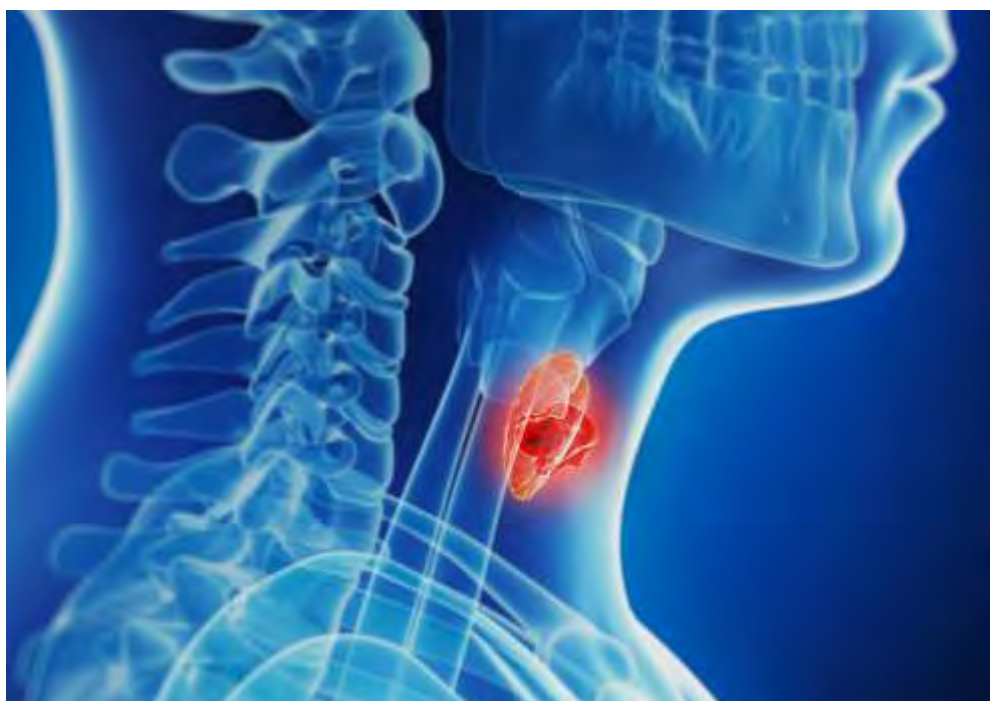


ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

**Μοριακή ανάλυση των γονιδίων BRAF και KRAS στον καρκίνο
του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό**



ΚΑΡΑΝΑΤΣΙΟΥ ΠΑΓΩΝΑ - ΜΑΡΙΑ

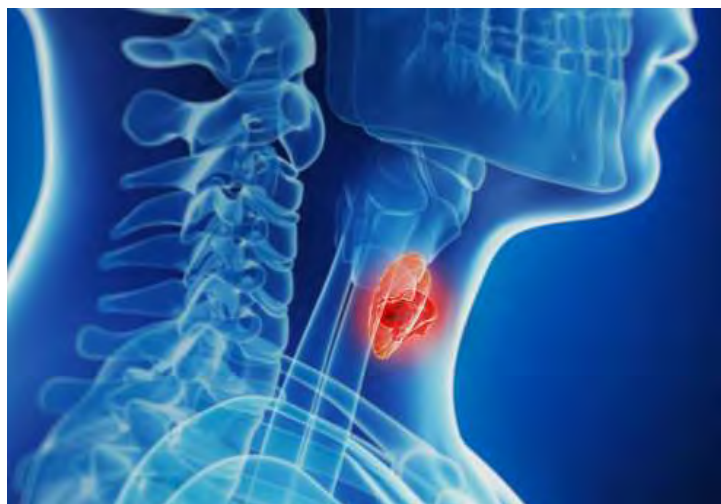
Επιβλέπων Καθηγήτρια: ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

**Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

ΛΑΡΙΣΑ 2015

Μοριακή ανάλυση των γονιδίων BRAF και KRAS στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό

Molecular analysis of BRAF and KRAS genes in thyroid cancer in the Greek population



Εικόνα Εξωφύλλου: Απεικόνιση του Καρκίνου του Θυρεοειδούς, με ραδιοσημασμένο ιώδιο (Wendy Sacks, MD; Glenn D. Braunstein, MD, <http://www.medscape.com/viewarticle/824261>)

Υπεύθυνη καθηγήτρια: **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια TBB, Π.Θ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αντικείμενο μελέτης της είναι η μοριακή ανάλυση των γονιδίων BRAF και KRAS σε διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη, επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αρχικά για την ανάθεση της παρούσας εργασίας αλλά κυρίως και για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου παρείχε για τη καλύτερη βελτίωση του κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του εργαστήριου της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη φιλοξενία αλλά και το εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για τη παροχή απαραίτητου εξοπλισμού για την εργασία.

Καρανάτσιου Παγώνα – Μαρία

Λάρισα 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Θυρεοειδής αδένας.....	9
1.1.1. Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος.....	9
1.1.2. Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος.....	10
1.1.2.1. Θυρεοειδείς ορμόνες.....	10
1.1.2.2. Παραγωγή θυρεοειδών ορμονών.....	11
1.1.2.3. Λειτουργίες του θυρεοειδούς αδένος.....	11
1.1.2.4. Ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος.....	11
1.1.3. Συχνότερες διαταραχές του θυρεοειδούς αδένος.....	12
1.2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ.....	13
1.2.1. Γενικά.....	13
1.2.2. Ιστολογική ταξινόμηση.....	14
1.2.2.1. Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς.....	15
1.2.2.2. Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς.....	17
1.2.2.3. Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς.....	18
1.2.2.4. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς.....	19
1.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών.....	20
1.3.1. Πρωτεΐνη BRAF.....	21
1.3.2. Πρωτεΐνες RAS.....	22
1.3.3. Διάγνωση και θεραπεία του θυρεοειδούς καρκίνου.....	24
1.3.4. Μοριακή διάγνωση του θυρεοειδούς καρκίνου.....	25
1.3.4.1. Γενικά.....	25
1.3.4.2. Μεταλλάξεις BRAF.....	27
1.3.4.3. Μεταλλάξεις RAS.....	27
1.3.4.4. Αναδιατάξεις RET/PTC.....	29
1.3.4.5. Αναδιατάξεις PAX8/PPARγ.....	29
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	31
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
2.1. Υλικά.....	32

2.1.1. Δείγματα.....	32
2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια.....	32
2.2. Μέθοδοι.....	33
2.2.1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών.....	33
2.2.1.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα.....	33
2.2.1.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης.....	34
2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	35
2.2.2.1. Αντιδραστήρια – Διαλύματα.....	35
2.2.2.2. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.....	35
2.2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	38
2.2.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	43
2.2.5. Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR.....	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA και ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής των γονιδίων BRAF και KRAS με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	45
3.2. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	47
3.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR.....	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί την πιο κοινή ενδοκρινή κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται ταχύτατα της τελευταίες δεκαετίες. Μπορούν να διακριθούν αρκετοί ιστολογικοί τύποι (θηλώδης, θυλακιώδης, μυελοειδής, αναπλαστικός) του καρκίνου του θυρεοειδούς, με διαφορετική κυτταρική προέλευση, χαρακτηριστικά και πρόγνωση, ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές αυτών, με την πιο κοινή να είναι ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου. Προηγούμενες μελέτες αποκάλυψαν πως ορισμένες μεταλλάξεις, ιδιαίτερα αυτές που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην παθογένεση του θυρεοειδούς καρκίνου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δημιουργεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις αυτές, όταν υπάρχουν, κατά τεκμήριο, αποκλείουν την ύπαρξη άλλων μεταλλάξεων. Αυτές περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF και στα γονίδια RAS (KRAS, HRAS και NRAS), καθώς και τις αναδιατάξεις RET/PTC και RAX8/PPARγ. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων BRAF (κωδικόνιο 600) και KRAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) στον ελληνικό πληθυσμό. Μελετήθηκαν συνολικά 18 δείγματα από ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ασθενών, το οποίο ενισχύθηκε στις υπό μελέτη περιοχές των γονιδίων BRAF και KRAS με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Στη συγκεκριμένη εργασία ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 600 (Val → Glu) του γονιδίου BRAF σε 3 από τα 18 δείγματα, ενώ δεν ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS. Εντούτοις, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, κρίνεται απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και να περιλαμβάνει την ανάλυση επιπρόσθετων μεταλλάξεων στα γονίδια BRAF και RAS και χρωμοσωμικών ανακατατάξεων.

ABSTRACT

Thyroid cancer is a common endocrine malignancy that has rapidly increased in global incidence in recent decades. There are several histological types (papillary, follicular, medullary and anaplastic) of thyroid cancer, with different cellular origins, characteristics and prognoses. Additional variants exist between these major types, with the most common being the follicular subtype of papillary carcinoma. Previous studies have shown that certain mutations, especially the ones which result in the activation of MAP kinase signaling pathway, play a fundamental role in the pathogenesis of thyroid cancer. It should be noted that the above mutations are mutually exclusive. These mutations include point mutations of the BRAF and RAS (KRAS, HRAS and NRAS) genes, as well as RET/PTC or PAX8/PPAR γ rearrangements. The purpose of this study was to investigate the correlation of point mutations of the BRAF gene (codon 600) and the KRAS gene (codons 12, 13 and 61) in the Greek population. The study involved 18 patients with differentiated thyroid cancer. The experimental procedure included the isolation of genomic DNA from tissues biopsies, specific amplification of the regions of interest using Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by sequencing of the PCR products. We identified mutations at codon 600 (Val \rightarrow Glu) of the BRAF gene at 3 out of 18 samples, but no mutations were identified at codons 12, 13 and 61 of the KRAS gene. However, in order to be able to draw firm conclusions, this study must be extended to include additional mutations of the BRAF and RAS genes, as well as chromosomal rearrangements in a larger sample population.

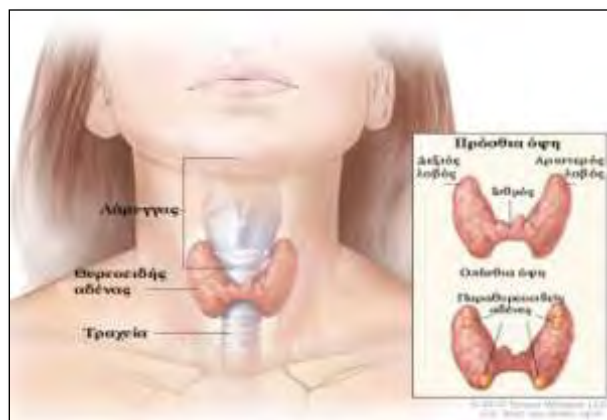
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θυρεοειδής αδένας

Το ενδοκρινικό σύστημα είναι το σύστημα οργάνων ενός οργανισμού που είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο μιας πληθώρας λειτουργιών, με κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας του εσωτερικού περιβάλλοντος του οργανισμού. Το ενδοκρινικό σύστημα αποτελείται από πολλούς αδένες που ονομάζονται ενδοκρινείς. Είναι αδένες χωρίς εκφορητικό πόρο και οι χημικές ουσίες, που παράγονται σε αυτούς, εκκρίνονται απευθείας στο αίμα και ονομάζονται ορμόνες. Για την έκκριση των ορμονών, το ενδοκρινές σύστημα συνεργάζεται με το νευρικό σύστημα. Έτσι, με την εμφάνιση κατάλληλου ερεθίσματος, το νευρικό σύστημα δίνει εντολή στο ενδοκρινές να εκκρίνει την κατάλληλη ορμόνη. Ένας από τους σημαντικότερους ενδοκρινείς αδένες του ανθρώπινου σώματος είναι ο θυρεοειδής αδένας (Σμοκοβίτης Α., 2007).

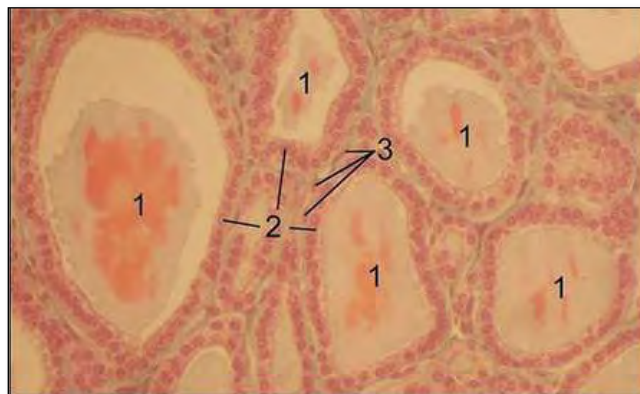
1.1.1. Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής είναι ένας ενδοκρινής αδένας που έχει σχήμα θυρεού (ασπίδας) και εντοπίζεται στο τράχηλο, αμέσως κάτω από το λάρυγγα και μπροστά από τη τραχεία. Έχει μικρό μέγεθος και βάρος (περίπου 15-25 γραμμάρια) και αποτελείται από δύο λοβούς που βρίσκονται δεξιά και αριστερά της τραχείας, με μια λωρίδα ιστού που τους ενώνει και καλείται ισθμός. Στην πίσω επιφάνεια των λοβών του θυρεοειδούς βρίσκονται τέσσερα μικρά μορφώματα μεγέθους φακής, που αποτελούν τους παραθυρεοειδείς αδένες (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος (2014. Vassilis I. Lagopoulos. <http://www.surgical-treatment.gr/Surgicaldiseases/Thyroid/>).

Η βασική μορφολογική μονάδα του θυρεοειδούς αδένος είναι το *θυρεοειδές κυστίδιο ή θυλάκιο* (thyroid follicle). Το θυρεοειδές θυλάκιο φέρει ένα απλό στρώμα επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλονται από ένα εξωκυτταρικό κεντρικό χώρο γεμάτο από μία κολλοειδή γλυκοπρωτεΐνη, ονομαζόμενη *θυρεοσφαιρίνη* (Vander et al., 2001). Ο χώρος ανάμεσα στα θυλάκια καταλαμβάνεται από συνδετικό ιστό, που διαθέτει ένα καλά αναπτυγμένο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων. Ο ιστός του θυρεοειδούς αποτελείται από δύο τύπους κυττάρων: τα *θυλακιώδη* (follicular) κύτταρα και τα *παραθυλακιώδη* (parafollicular) κύτταρα (Εικόνα 2) (Fallahi et al., 2014).



Εικόνα 2: Ιστολογία του θυρεοειδούς αδένος. 1. Τα θυρεοειδικά θυλάκια, 2. Τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς, 3. Τα παραθυλακιώδη κύτταρα (C cells) του θυρεοειδούς (Fawcett & Jensh, 2002).

1.1.2. Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος

1.1.2.1. Θυρεοειδείς ορμόνες

Ο θυρεοειδής αδένος αποτελείται στο μεγαλύτερό του ποσοστό από τα θυρεοειδή θυλάκια. Τα θυλάκια αυτά, και συγκεκριμένα τα θυλακιώδη κύτταρα, εκκρίνουν δύο αμινορμόνες, οι οποίες περιέχουν ιώδιο, τη **θυροξίνη (T₄)** και την **τριιωδοθυρονίνη (T₃)**. Οι ορμόνες αυτές εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος και είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία όλων των κυττάρων του σώματος (Vander et al., 2001).

Τα παραθυλακιώδη κύτταρα ή κύτταρα C, που βρίσκονται ανάμεσα στα θυλάκια, εκκρίνουν μία τρίτη ορμόνη, ένα πεπτίδιο που ονομάζεται **καλσιτονίνη**. Η ορμόνη αυτή δεν περιέχει ιώδιο και συγκαταλέγεται στις παραθυρεοειδείς ορμόνες (Vander et al., 2001). Ο κύριος ρόλος της είναι να ελαττώνει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο πλάσμα και να αυξάνει την απέκκριση του ίδιου στοιχείου στα ούρα (Ι. Γ. Γεωργιάτσου et al., 2005).

1.1.2.2. Παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών

Για τη σύνθεση των ορμονών T_3 και T_4 είναι απαραίτητη η συμμετοχή του ιωδίου. Το 90-95% του προσλαμβανόμενου ιωδίου μεταφέρεται με μορφή ιωδιούχων μέσω του αίματος και εισέρχεται στα αδενικά κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος με μηχανισμό ενεργούς μεταφοράς. Στα θυλακιώδη κύτταρα τα ιόντα ιωδίου οξειδώνονται και ενώνονται με το αμινοξύ τυροσίνη του μορίου της θυρεοσφαιρίνης. Έτσι, σχηματίζονται η *μονοϊωδιοτυροσίνη* (monoiodotyrosine, MIT) και η *διωδιοτυροσίνη* (diiodotyrosine, DIT). Δύο μόρια διωδιοτυροσίνης παράγουν την ορμόνη *θυροξίνη* (thyroxine, T_4), ενώ ένα μόριο διωδιοτυροσίνης και ένα μόριο μονοϊωδιοτυροσίνης παράγουν την ορμόνη *τριωδιοθυρονίνη* (triiodothyronine, T_3) (Σμοκοβίτης Α., 2007). Κατά τη διάρκεια ορμονικής έκκρισης η θυρεοσφαιρίνη μετακινείται στα θυλακοειδή κύτταρα με ενδοκυττάρωση, όπου συντήκεται με τα λυσοσώματα, διασπάται και απελευθερώνονται οι θυρεοειδικές ορμόνες. Αυτές διασχίζουν τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και εισέρχονται στο αίμα. Η T_4 εκκρίνεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από την T_3 . Διάφοροι όμως ιστοί, όπως ο ήπαρ και οι νεφροί μετατρέπουν σημαντική ποσότητα της T_4 σε T_3 με ενζυματική απομάκρυνση ενός ατόμου ιωδίου (Vander et al., 2001).

1.1.2.3. Λειτουργίες του θυρεοειδούς αδένος

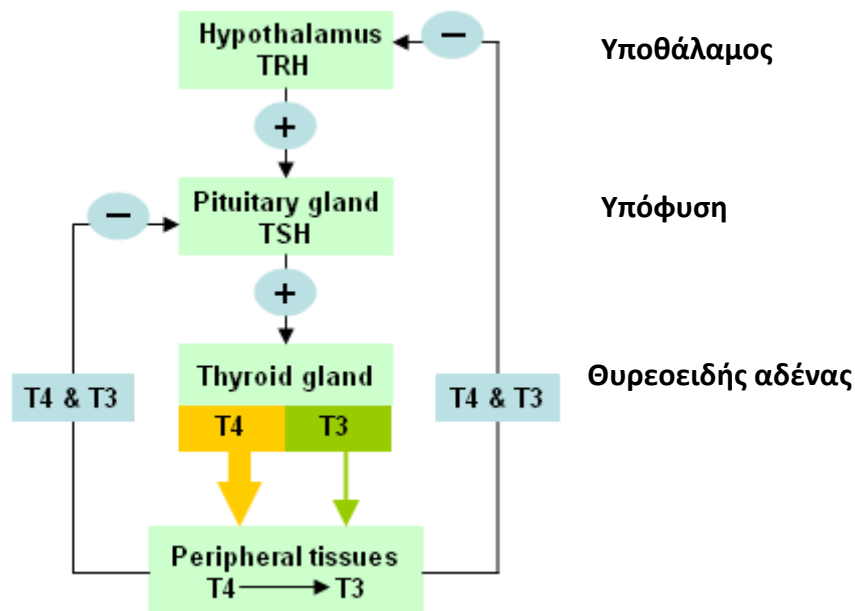
Οι κύριες φυσιολογικές δράσεις των θυρεοειδών ορμονών είναι η ρύθμιση της κατανάλωσης οξυγόνου και η ρύθμιση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπών. Επιπλέον ρυθμίζουν τη σύνθεση και αποικοδόμηση πολλών άλλων ορμονών και αυξητικών παραγόντων και με αυτόν τον τρόπο έχουν επιπτώσεις σε ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών διαδικασιών. Εκτός από τις παραπάνω δράσεις, οι ορμόνες T_4 και T_3 επιδρούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στο αναπαραγωγικό σύστημα (Ι. Γ. Γεωργιάτσου et al., 2005).

Οι ορμόνες που παράγονται από τους παραθυρεοειδείς αδένες, δηλαδή η παραθυρορμόνη και η καλσιτονίνη, είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση μιας σταθερής συγκέντρωσης ασβεστίου στον οργανισμό. Οι ενέργειες των ορμονών αυτών είναι ανταγωνιστικές όσον αφορά τη μετακίνηση ασβεστίου και φωσφόρου από τα οστά και την απέκκριση ασβεστίου, αλλά είναι συναγωνιστικές όσον αφορά την απέκκριση φωσφόρου (και οι δύο ορμόνες μειώνουν την επαναρρόφηση - αυξάνουν την απέκκριση - φωσφόρου από τα ουροφόρα σωληνάκια του νεφρού) (Σμοκοβίτης Α., 2007).

1.1.2.4. Ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος

Η θυρεοειδική ορμόνη (TH) ασκεί αρνητική ανατροφοδότηση (negative-feedback) στο υποθαλαμοϋποφυσιακό σύστημα. Συγκεκριμένα, ο υποθάλαμος εκκρίνει την ορμόνη *θυρεοτροπίνη* (TRH), η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην απελευθέρωση της *θυρεοειδοτρόπου ορμόνης* (thyroid stimulating hormone, TSH) από την

υπόφυση. Η ορμόνη TSH διεγείρει την έκκριση των ορμονών T_3 και T_4 από τον θυρεοειδή αδένα. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ορμονών T_3 και T_4 στο αίμα αναστέλλει την έκκριση των TSH και TRH, ενώ η μείωση της συγκέντρωσης των T_3 και T_4 στο αίμα διεγείρει την έκκριση των TSH και TRH (Εικόνα 3) (Σμοκοβίτης Α., 2007).



Εικόνα 3: Ρύθμιση της έκκρισης ορμονών T_4 και T_3 (BMJ Best Practice, <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/1121.html>).

1.1.3. Συχνότερες διαταραχές του θυρεοειδούς αδένος

Οι διαταραχές του θυρεοειδούς είναι πολύ συχνές και τείνουν να εμφανίζονται στις γυναίκες, ενώ επηρεάζουν και άνδρες, έφηβους, παιδιά και βρέφη. Οι ορμόνες T_3 και T_4 επηρεάζουν το μεταβολισμό όλων των κυττάρων του σώματος. Συγκεκριμένα, ρυθμίζουν την ταχύτητα με την οποία λειτουργούν τα κύτταρα του σώματος. Έτσι, όταν παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα συγκεντρώσεων των ορμονών T_4 και/ή T_3 στο αίμα, ο θυρεοειδής αδένος υπολειτουργεί και το φαινόμενο αυτό καλείται *υποθυρεοειδισμός* (Hypothyroidism). Ο υποθυρεοειδισμός μπορεί να είναι πρωτογενής, δηλαδή, να οφείλεται σε βλάβη του θυρεοειδούς (αδυναμία πρόσληψης ιωδίου) ή δευτερογενής, δηλαδή, να οφείλεται σε βλάβη της υπόφυσης, η οποία παράγει τη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), που φυσιολογικά δίνει την εντολή από τον εγκέφαλο στο θυρεοειδή για την παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών. Τα πιο κοινά συμπτώματα του υποθυρεοειδισμού είναι υπνηλία, αύξηση του βάρους λόγω μείωσης του μεταβολικού ρυθμού, αίσθημα κόπωσης, βραχνάδα φωνής και μυαλγίες (Σμοκοβίτης Α., 2007).

Από την άλλη πλευρά, αν παραχθεί αυξημένη ποσότητα των θυρεοειδικών ορμονών εξαιτίας της παρουσίας γ-σφαιρινών στο πλάσμα του αίματος, τα κύτταρα και τα όργανα του σώματος παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα. Η κατάσταση αυτή καλείται *υπερθυρεοειδισμός* (Hyperthyroidism). Ο υπερθυρεοειδισμός μπορεί να είναι πρωτογενής, όπου παρατηρείται υπερπαραγωγή θυροξίνης-τριιωδιοθυρονίνης μετά από κάποιο, συνήθως, νεόπλασμα του θυρεοειδούς αδένα ή δευτερογενής με κύριο χαρακτηριστικό την υπερπαραγωγή TSH, από κάποιο συνήθως νεόπλασμα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Τα πιο κοινά συμπτώματα του υπερθυρεοειδισμού είναι η απώλεια βάρους, η πολυφαγία, ο αυξημένος βασικός μεταβολισμός και η νευρική κατάσταση (Σμοκοβίτης Α., 2007).

1.2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

1.2.1. Γενικά

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα αποτελεί τον πιο κοινό τύπο κακοήθειας του ενδοκρινικού συστήματος και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται με σταθερό ρυθμό σε πολλές χώρες (Nikiforov, 2011). Πολλοί ερευνητές αποδίδουν την αύξηση της συχνότητας, ως αποτέλεσμα της έκθεσης στην ακτινοβολία του περιβάλλοντος, ενώ κάποιοι άλλοι αδυνατούν να εντοπίσουν την κύρια πηγή της αιτίας (Davies & Welch, 2006). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα παρουσιάζεται με τη μορφή μονήρους όζου, δηλαδή, ως μία τοπική διόγκωση, ο οποίος μπορεί να παρουσιαστεί ως ψηλαφητή μάζα στο τράχηλο. Από τους ασυμπτωματικούς ασθενείς, εάν εξετασθούν με υπερηχοτομογράφο, το 50-70% έχουν όζο, λιγότερο από το 5% αυτών θα έχουν κακοήθεια ενώ οι περισσότεροι είναι κύστες (Liebner & Shah, 2011).

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα αντιπροσωπεύει περίπου το 1% όλων των καρκίνων του ανθρώπου στις ανεπτυγμένες χώρες. Η συχνότητά του ποικίλλει σε σχέση με το φύλο, τη φυλή και την εθνικότητα, παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν και τη χρήση της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής (Enewold et al., 2008). Επιπλέον, ο καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, με τις περισσότερες, όμως, περιπτώσεις της νόσου να εκδηλώνονται σε ανθρώπους άνω των 40 ετών. Οι γυναίκες προσβάλλονται 2-3 φορές συχνότερα από τους άντρες ενώ εμφανίζεται σπάνια σε παιδιά.

Ο κύριος στόχος της εκτίμησης των ασθενών με όζους του θυρεοειδούς είναι η διάκριση του καρκίνου του θυρεοειδούς από τα καλοήγη οζίδια. Η ταυτοποίηση αυτή γίνεται με παρακέντηση με λεπτή βελόνα (FNA-Fine Needle Aspiration). Έτσι, μια πολύ λεπτή βελόνα εισέρχεται στον όζο του θυρεοειδούς και αναρροφάται κυτταρολογικό υλικό. Στη συνέχεια, το υλικό αυτό αποστέλλεται στον κυτταρολόγο, ο οποίος θα καθορίσει την πιθανή κακοήθεια. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών είναι καλοήθεις, δεν προκαλούν λειτουργικές διαταραχές και διακρίνονται σε ψυχρούς και θερμούς όζους.

1.2.2. Ιστολογική ταξινόμηση

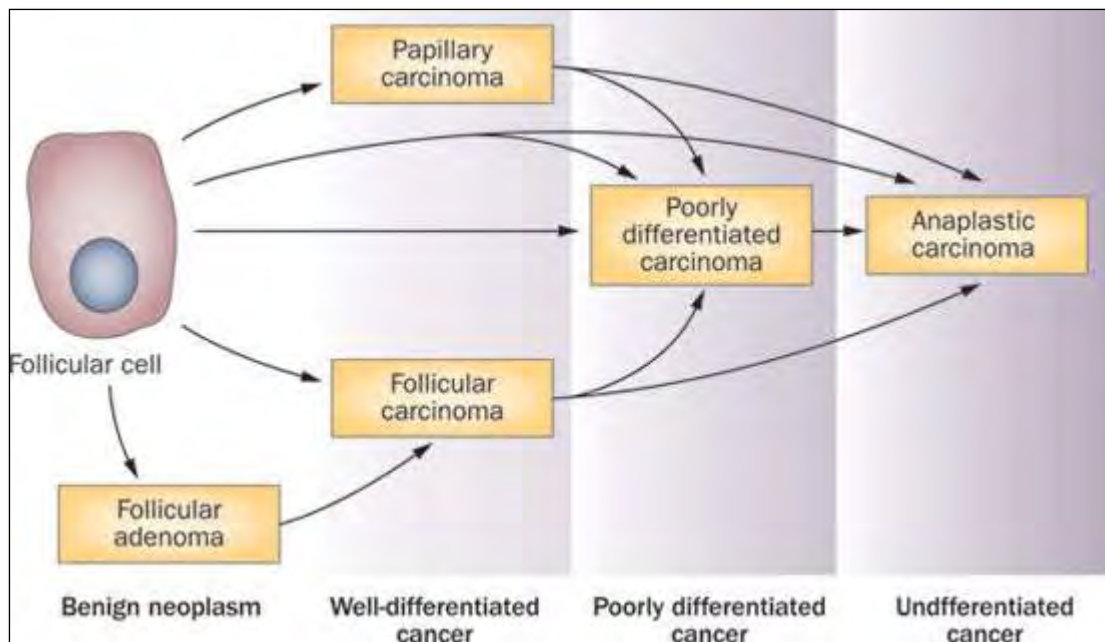
Υπάρχουν αρκετοί ιστολογικοί τύποι και υπότυποι του καρκίνου του θυρεοειδούς με διαφορετική κυτταρική προέλευση, χαρακτηριστικά και πρόγνωση. Οι όγκοι του καρκίνου του θυρεοειδούς μπορεί να προέρχονται από τα θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα, από τα παραθυλακιώδη ή τα κύτταρα C καθώς και από μη επιθηλιακά στοιχεία του στρώματος (*Scora, 2004*).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (*Hedinger et al., 1989*), οι πρωτοπαθείς όγκοι του θυρεοειδούς αδένος κατηγοριοποιούνται σε επιθηλιακούς και μη επιθηλιακούς, καλοήθεις ή κακοήθεις, κατατάσσοντας σε μία ξεχωριστή ενότητα τα λεμφώματα και τα διάφορα νεοπλάσματα. Επιπλέον, υπάρχουν και οι δευτεροπαθείς ή μεταστατικοί όγκοι του θυρεοειδούς αδένος, οι οποίοι είναι πιο σπάνιοι (*Scora, 2004*).

Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου προέρχονται από τα θυρεοειδή θυλακιώδη κύτταρα (thyroid follicular cells), δηλαδή είναι επιθηλιακοί όγκοι. Αυτοί περιλαμβάνουν τον θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (papillary thyroid cancer, PTC), τον θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (follicular thyroid cancer, FTC), τον χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο του θυρεοειδούς (poorly differentiated thyroid cancer) και τον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς (anaplastic thyroid cancer, ATC) (*Nikiforov, 2011*). Ο θηλώδης και ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς αντιπροσωπεύουν πάνω από το 95% όλων των περιπτώσεων καρκίνου (*Kebebew et al., 2007*).

Ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου (περίπου 80%) και ακολουθείται από τον θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (περίπου 16%) (*Hundahl et al., 1998*). Οι θυλακιώδεις όγκοι του θυρεοειδούς υποδιαιρούνται στον συμβατικό καρκίνο (conventional cancer) και στον ογκοκυττικό καρκίνο (Hürthle type) (*Nikiforov, 2011*). Το συμβατικό καρκίνωμα, κατ' ουσίαν, δεν περιλαμβάνει ποτέ περιφερικούς λεμφαδένες αλλά προκαλεί μεταστάσεις στα οστά και στους πνεύμονες (*Nikiforova et al., 2003*). Τα ογκοκυττικά αδενώματα προσβάλλουν περιφερικούς λεμφαδένες ενώ παράλληλα προκαλούν και μεταστάσεις που μεταδίδονται μέσω του αίματος (*Nikiforova et al., 2003*).

Τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και τα αναπλαστικά καρκινώματα προέρχονται, επίσης, από τα θυλακιώδη κύτταρα, ενώ θεωρείται ότι αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα της αποδιαφοροποίησης των καλά-διαφοροποιημένων θηλωδών ή θυλακιδωδών καρκινωμάτων (*Εικόνα 4*) (*Nikiforov, 2011*).

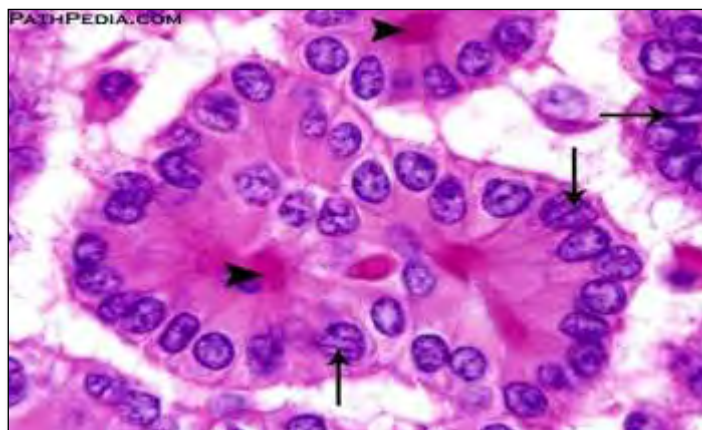


Εικόνα 4: Σχέδιο της υποτιθέμενης αποδιαφοροποίησης των όγκων του θυρεοειδούς που προέρχεται από θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς (Nikiforov & Nikiforova, 2011).

Τέλος, ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς προέρχεται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα η κύτταρα C και υπολογίζεται ότι αποτελεί περίπου το 3% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2011).

1.2.2.1. Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (PTC) είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνος του θυρεοειδούς, ο οποίος αντιπροσωπεύει περίπου το 80% όλων των πρωτοπαθών νεοπλασμάτων που σχετίζονται με το θυρεοειδή αδένα (Baloch & LiVolsi, 2002). Αυτός ο τύπος καρκίνος του θυρεοειδούς χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό θηλών και από μία σειρά με διακριτές πυρηνικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, οι πυρήνες έχουν ωοειδές σχήμα, είναι διογκωμένοι, με βαθιές αυλακώσεις και αρκετά εγκλείσματα (Εικόνα 5) (Xing, 2013). Επίσης, οι θηλώδεις καρκίνοι είναι συνήθως 'διεισδυτικοί' (infiltrative), δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διηθηθούν στο γειτονικό ιστό του θυρεοειδούς, ενώ το μέγεθος ενός θηλώδους καρκινώματος είναι εξαιρετικά μεταβλητό με μέση διάμετρο 2-3 cm².



Εικόνα 5: Απεικόνιση του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς με χαρακτηριστικούς διογκωμένους πυρήνες (PATHPEDIA, Global Online Pathology Resource - Papillary Carcinoma http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/thyroid_gland/papillary_carcinoma.aspx).

Σε γενικές γραμμές, οι καλά διαφοροποιημένοι PTC έχουν μία εξαιρετικά σημαντική πρόγνωση με πενταετή επιβίωση να είναι μεγαλύτερη από 97% (SEER Cancer Stat Fact Statistics, 2015, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>). Οι ασθενείς κάτω των 45 ετών έχουν εξαιρετική πρόγνωση και θεωρούνται ομάδα χαμηλού κινδύνου, ενώ οι άνω των 45 ετών ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου καθώς ο καρκίνος δείχνει μία πιο επιθετική συμπεριφορά. Στους ανήλικους (κάτω των 17 ετών) η συμπεριφορά του θηλώδους καρκινώματος είναι διαφορετική από τις άλλες ηλικίες.

Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς διαδίδεται συχνά μέσω των λεμφαγγείων του θυρεοειδούς ή και με μακρινές μεταστάσεις, με αποτέλεσμα στη πρώτη περίπτωση, στο 1/3 των ασθενών να υπάρχει επινέμηση και διόγκωση των επιχώριων τραχηλικών λεμφαδένων, ενώ η αιματογενής διασπορά είναι σπάνια (Nikiforov, 2011). Συνεπώς, η ολική θυρεοειδεκτομή και ο λεμφαδενικός καθαρισμός του κεντρικού διαμερίσματος αποτελεί την καλύτερη χειρουργική επέμβαση στο θηλώδες καρκίνωμα, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο υποτροπιασμός του. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η χρήση κατάλληλων μοριακών δεικτών, έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την επικινδυνότητα και να προβλέψει την πιθανότητα υποτροπιασμού σε ασθενείς με PTC, συμβάλλοντας στη λήψη καλύτερων αποφάσεων για τη μακροχρόνια διαχείρισή του (Xing et al., 2005).

Τέλος, υπάρχουν διάφορες ιστολογικές παραλλαγές του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Πίνακας 1). Η πιο γνωστή παραλλαγή είναι ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (FVPTC), που περιέχει χαρακτηριστικά τόσο του PTC όσο και του FTC. Κατατάσσεται, όμως, ως υπότυπος του PTC, γιατί παρά τη συνολική θυλακιώδη δομή, επιδεικνύει τα πυρηνικά χαρακτηριστικά του PTC. Οι μεταστάσεις μπορεί να έχουν ένα μικτό θηλώδη και θυλακιώδη σχηματισμό (Scora, 2004). Ένα σημαντικό πρόβλημα που συναντάται στην ταξινόμηση των διαφόρων υποτύπων του θηλώδους καρκίνου είναι ότι τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό αυτών των υποτύπων δεν είναι αυστηρά

καθορισμένα, γεγονός που οδηγεί σε ασυμφωνία μεταξύ των διαφορετικών παθολόγων.

Πίνακας 1: Ιστολογικές παραλλαγές του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Scora, 2004).

Papillary microcarcinoma

Encapsulated variant

Follicular variant

Tall and columnar cell variant

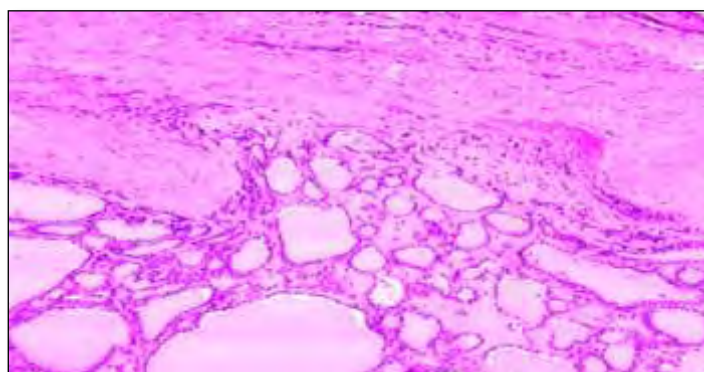
Diffuse sclerosing variant

Other variants

1.2.2.2. Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ένας επιθηλιακός όγκος του θυρεοειδούς, που παρουσιάζει διαφοροποίηση των θυλακιωδών κυττάρων, αλλά έλλειψη των διαγνωστικών χαρακτηριστικών του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Εικόνα 6) (Liska et al., 2005). Αυτός ο τύπος καρκίνου αντιπροσωπεύει το 15% όλων των θυρεοειδικών όγκων και σπάνια προκύπτει από καλοήγη αδενώματα ως αποτέλεσμα μετασχηματιστικών γεγονότων.

Διακρίνονται δύο βασικοί τύποι του θυλακιώδους καρκινώματος, αυτό με ελάχιστη διήθηση (minimally invasive) και εκείνο με ευρεία διήθηση (widely invasive) και με επιθετικότερη συμπεριφορά. Η συχνότητα του θυλακιώδους καρκινώματος μεταξύ των θυρεοειδών κακοηθειών κυμαίνεται μεταξύ 5 με 10% σε περιοχές χωρίς ανεπάρκεια ιωδίου, και μεταξύ 30 με 40% σε περιοχές με ανεπάρκεια ιωδίου (Rosai et al., 1992). Όσον αφορά τον τρόπο διάδοσης των κακοηθών καρκινωμάτων, το συμβατικό θυλακιώδες καρκίνωμα δεν εμπλέκεται σε περιφερειακές λεμφαδενικές μεταστάσεις αλλά χαρακτηρίζεται από μακρινές μεταστάσεις, κυρίως στους πνεύμονες και στα οστά (10-20% των περιπτώσεων). Το ογκοκυττικό καρκίνωμα, από την άλλη πλευρά, αναπτύσσει αιματογενείς μεταστάσεις αλλά διαδίδεται επίσης και μέσω των περιφερικών λεμφαδένων (Nikifrova et al., 2003).



Εικόνα 6: Θυλακιώδης Καρκίνος του Θυρεοειδούς
(<http://pathologyoutlines.com/topic/thyroidfollicular.html>).

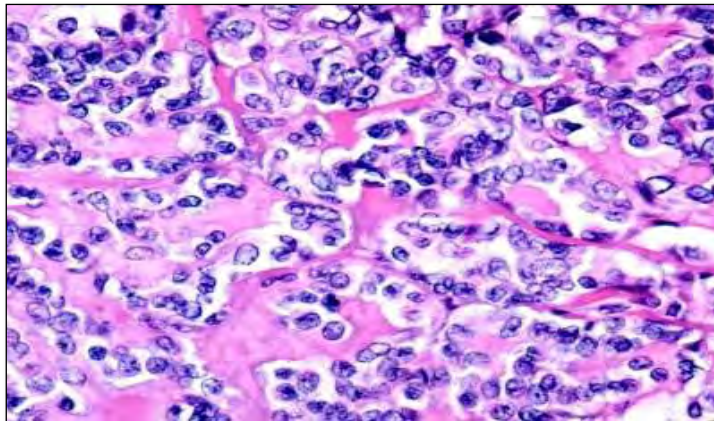
Η προεγχειρητική διάγνωση των θυλακιωδών όγκων είναι αρκετά δύσκολη επειδή τα αδενώματα και τα καρκινώματα μοιράζονται παρόμοια κυτταρολογικά χαρακτηριστικά (Nikifrova et al., 2003). Εντούτοις, τα σημερινά διαγνωστικά κριτήρια των κακοηθειών αυτών, σχετίζονται με την ιστολογική αξιολόγηση της κάψας (όπου δηλαδή ο όγκος πρέπει να διαπερνά ολόκληρο το πάχος της κάψας) και/ή με την εισβολή των αιμοφόρων αγγείων μέσα ή πέρα από αυτή (Scora, 2004). Είναι φανερό, πως τα καρκινώματα με την ελάχιστη διήθηση δεν μπορούν να διαγνωστούν επακριβώς με τη παρακέντηση βιοψίας με λεπτή βελόνα (fine needle aspiration biopsy), δεδομένου ότι τα κρίσιμα διαγνωστικά κριτήρια απουσιάζουν.

Κακοήθεις όγκοι του θυρεοειδούς που αποτελούνται αποκλειστικά ή κατά κύριο λόγο (άνω του 75%) από ογκοκύτταρα (κυτταρικοί όγκοι του Hürthle), μοιράζονται κάποιες ομοιότητες με τα θυλακιώδη καρκινώματα όσον αφορά την κλινική εικόνα, τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά και τον βαθμό διεισδυτικότητας και ως εκ τούτου θεωρούνται μία παραλλαγή του θυλακιώδους καρκίνου του θυρεοειδούς. Ωστόσο, ορισμένοι συγγραφείς έχουν προτείνει ότι τα μορφολογικά αυτά χαρακτηριστικά είναι αρκετά διακριτά, ώστε να μπορούν να θεωρούνται ως μία ξεχωριστή κοινότητα (Carcangiu et al. 1991; Pappoti et al., 1996).

1.2.2.3. Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (MTC) προέρχεται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα ή κύτταρα C, τα οποία σε φυσιολογικές συνθήκες εκκρίνουν την ορμόνη καλσιτονίνη. Αυτός ο τύπος καρκίνου αντιπροσωπεύει περίπου το 3% όλων των θυρεοειδών καρκινωμάτων και πιστεύεται πως είναι κληρονομήσιμος στο 25% περίπου των περιπτώσεων (Leboulleux et al., 2004).

Ο MTC είναι σταθερός και άλλοτε έχει κόκκινο χρώμα ή είναι υπόλευκος. Από ιστολογική σκοπιά, το μυελοειδές καρκίνωμα συνίσταται από καλά σχηματιζόμενους άξονες, δημιουργώντας λεπτές στρώσεις και κυκλικά ή πολυγωνικά κύτταρα, τα οποία διαχωρίζονται από ένα ινώδες στρώμα. Οι πυρήνες έχουν συνήθως ομοιόμορφο σχήμα και σπάνια παρουσιάζουν μιτωτικές μορφές. Τέλος, το κυτταρόπλασμα είναι εωσινόφιλο ενώ παρατηρούνται εναποθέσεις αμυλοειδούς μεταξύ των κυτταρικών όγκων (Εικόνα 7) (Leboulleux et al., 2004).



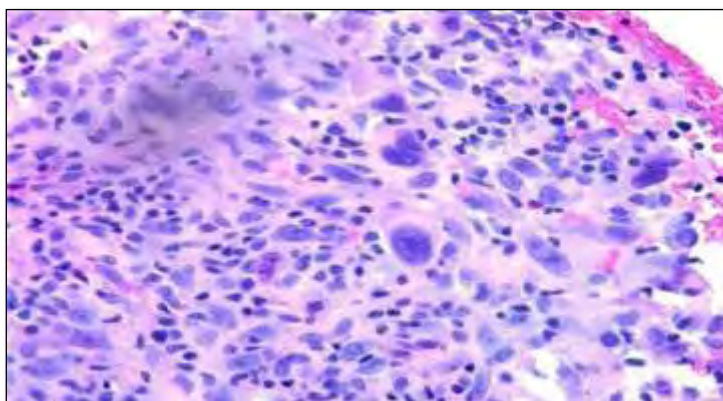
Εικόνα 7: Απεικόνιση του Μυελοειδούς Καρκίνου του Θυρεοειδούς , με άφθονο αμυλοειδές
(Papanikolaou Society of Cytopathology,
<http://www.papsociety.org/atlas/displayimage.php?album=46&pos=11>).

Διογκωμένοι τραχηλικοί λεμφαδένες συνυπάρχουν στο 50% των ασθενών κατά το χρόνο της διάγνωσης, ενώ μακρινές μεταστάσεις στους πνεύμονες, ήπαρ και οστά μπορεί να εμφανιστούν σε ποσοστό μέχρι και 10%. Το μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς αναφέρεται σε ποσοστό 75% σαν σποραδικό και 25% στην οικογενή μορφή, συνήθως στα πλαίσια του συνδρόμου πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας τύπου 2 (MEN 2). Τα σποραδικά καρκινώματα έχουν συνήθως βαρύτερη πρόγνωση από τα οικογενή. Τέλος, ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς χαρακτηρίζεται από μία δεκαετή επιβίωση, σε ποσοστό 40-60%, με την οικογενή μορφή να έχει καλύτερη πρόγνωση. Ο θάνατος, συνήθως, επέρχεται μετά από εκτεταμένες μεταστάσεις, οι οποίες αφορούν κυρίως τους τραχηλικούς λεμφαδένες και το μεσοθωράκιο, ενώ έπειτα, ακολουθούν οι πνεύμονες, το ήπαρ και τα οστά. Η μόνη αποτελεσματική θεραπεία, σε αυτό τον τύπο καρκινώματος, είναι η χειρουργική, η οποία αφορά ολική θυρεοειδεκτομή και ριζικό λεμφαδενικό τραχηλικό καθαρισμό.

1.2.2.4. Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς (ATC), είναι ένας σπάνιος, με αυξημένη επιθετικότητα όγκος, που χαρακτηρίζεται από ταχύτατη εξέλιξη, με γενικευμένες μεταστάσεις (Haigh, 2000). Μπορεί να δημιουργηθεί είτε de novo είτε από κύτταρα PTC, FTC ή PDTC που από-διαφοροποιούνται (Εικόνα 4). Εμφανίζεται σε άτομα μεγάλης ηλικίας (άνω των 60 ετών), ο μέσος όρος επιβίωσης είναι 6 μήνες μετά τη διάγνωση και δυστυχώς, αυτό το αποτέλεσμα, δε μεταβάλλεται από τις διαθέσιμες θεραπείες (Neff et al., 2008). Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις ότι μία πολυπαραγοντική προσέγγιση που περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση (ολική θυρεοειδεκτομή), χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία, είναι προτιμώμενη, εάν εντοπιστεί η νόσος.

Ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα μορφολογικών τύπων, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό αυτών (Εικόνα 8). Περιλαμβάνει τρεις μορφολογικούς τύπους, οι οποίοι εμφανίζουν όλοι υψηλή μιτωτική δραστηριότητα, εκτεταμένη νέκρωση και έναν αξιοσημείωτο βαθμό εισβολής εντός του αδένα καθώς και σε εξωθυρεοειδικές δομές (Rosai et al., 1992; LiVolsi, 1990).



Εικόνα 8: Αναπλαστικός Καρκίνος του Θυρεοειδούς (Surgical Pathology Atlas, <http://www.surgicalpathologyatlas.com/glfusion/mediagallery/media.php?s=20080802165939445>).

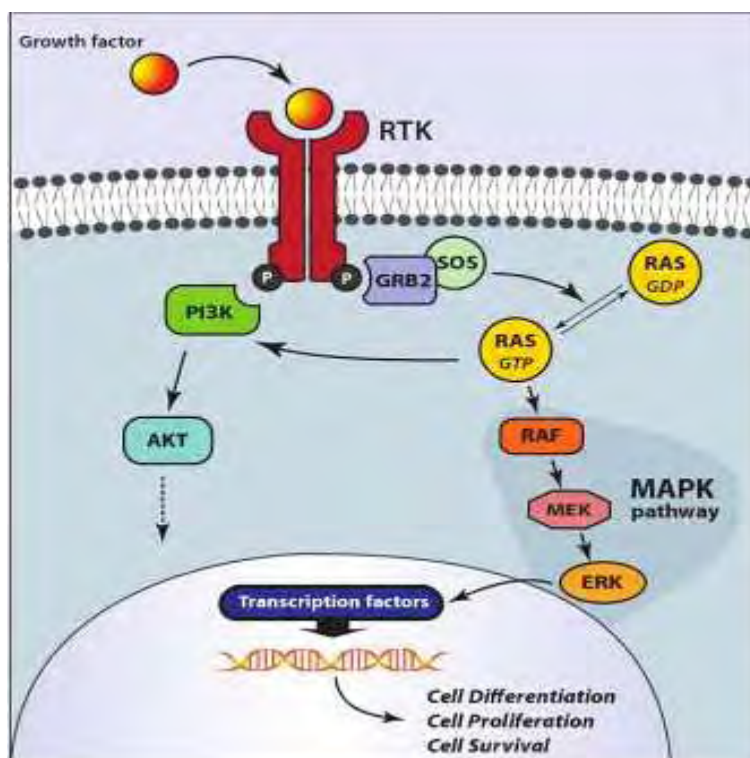
1.3. Σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών

Το μονοπάτι των MAPKs (Mitogenic activated protein kinases) είναι ένα ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος απαραίτητο σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν την κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και απόπτωση. Το μονοπάτι των MAPKs συμβάλλει στη ρύθμιση της αύξησης και της διαφοροποίησης, μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων, οδηγώντας έτσι στη μακροπρόθεσμη ενεργοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων πρωτεϊνικών κινασών. Οι MAPK μπορούν να ενεργοποιηθούν από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (RTKs), από υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) με τη μεσολάβηση G πρωτεϊνών ή με μηχανισμούς ανεξάρτητους από G πρωτεΐνες.

Έτσι, σε φυσιολογικά κύτταρα, ο καταρράκτης σηματοδότησης MAPK αρχίζει με τη πρόσδεση αυξητικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), στους μονομερείς υποδοχείς τους (RTKs) (Εικόνα 9). Η δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα του, προκαλεί τον διμερισμό του υποδοχέα και την αυτοφωσφορυλίωσή του σε κατάλοιπα Tyr. Στις φωσφορυλιωμένες Tyr του υποδοχέα συνδέεται μέσω της SH2 περιοχής της, η πρωτεΐνη προσαρμογέας Grb2 (growth factor receptor binding protein). Στην Grb2, στη συνέχεια, συνδέεται ο SOS, ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, ο οποίος ενεργοποιεί τη μικρή GTPάση Ras.GDP, ανταλλάσσοντας το GDP σε GTP. Η Ras μέσω του C-τελικού πρενυλιωμένου άκρου της βρίσκεται στην

πλασματική μεμβράνη. Έπειτα, η Ras.GTP στρατολογεί στη μεμβράνη την πρώτη κινάση του μονοπατιού MAPK, την κινάση Ser/Thr Raf, (Nikiforov *et al.*, 2012).

Στην κατάσταση ηρεμίας, η κινάση MEK, βρίσκεται συνδεδεμένη με τη πρωτεΐνη σκαλωσιάς KSR, η οποία λόγω της φωσφορυλιωμένης της κατάστασης παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Η διέγερση, όμως, του αυξητικού παράγοντα και η ενεργοποίηση της φωσφατάσης 2A, αποφωσφορυλιώνει την KSR, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεση της ERK στη σκαλωσιά (Nikiforov *et al.*, 2012). Τέλος, η ERK ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης άλλους τελεστές και μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμίζοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση.



Εικόνα 9: Απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI3K/AKT (Nikiforov *et al.*, 2012).

Επίσης, η δέσμευση του αυξητικού παράγοντα στον υποδοχέα του μπορεί να ενεργοποιήσει και το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) protein kinase B (AKT)) (Εικόνα 9) (Nikiforov *et al.*, 2012).

Τέλος, και τα δύο αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγούν στην ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι στη συνέχεια πυροδοτούν κυτταρικές αποκρίσεις, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση των κυττάρων.

1.3.1. Πρωτεΐνη BRAF

Η πρωτεΐνη BRAF αποτελεί μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών RAF. Έχει βάρος 94 KDa, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 και είναι μία πρωτεΐνη κινάση σερίνης-θρεονίνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο BRAF (Kebebew *et al.*, 2007). Η

οικογένεια των πρωτεϊνών RAF περιλαμβάνει τρεις ισομορφές: την ARAF, την BRAF και την CRAF. Και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες, προκειμένου να ενεργοποιηθούν και να εκδηλώσουν τη δράση τους, πρέπει, αρχικά, να φωσφορυλιωθούν. Παρ' όλα αυτά, εντοπίζονται διαφορές, όσον αφορά τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς δράσης τους. Οι ισομορφές ARAF και CRAF απαιτούν μία επιπλέον φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης-τυροσίνης της N-τελικής περιοχής τους, ούτως ώστε να επιτευχθεί μια πλήρης δραστηριότητα ενώ η πρωτεΐνη BRAF έχει από μόνη της υψηλή δραστηριότητα κινάσης.

Εντούτοις, αν και η κάθε ισομορφή παίζει σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-RAF, η ισομορφή BRAF είναι ο κύριος ενεργοποιητής του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών. Προκλινικές μελέτες δείχνουν ότι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF (BRAF^{V600E}) οδηγούν σε μία συνεχή δραστηριοποίηση της κινάσης BRAF, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού MEK και ERK, έχοντας ως αποτέλεσμα τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την επιβίωσή τους, ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένοι θηλώδεις καρκίνοι του θυρεοειδούς, εμφανίζουν ετερογένεια στο γονότυπο BRAF. Συγκεκριμένα, σε μία μειονότητα των θυρεοειδικών κυττάρων εδρεύει η μετάλλαξη BRAF^{V600E} ενώ στη πλειοψηφία αυτών, κυριαρχούν τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου BRAF. Αυτό δημιουργεί μία ενδιαφέρουσα εκδοχή για το εάν η μετάλλαξη BRAF^{V600E} είναι εκείνη που δίνει το έναυσμα για τη δημιουργία όγκων ή γίνεται αντιληπτή μετά την εμφάνιση θυρεοειδικών όγκων (Xing 2005).

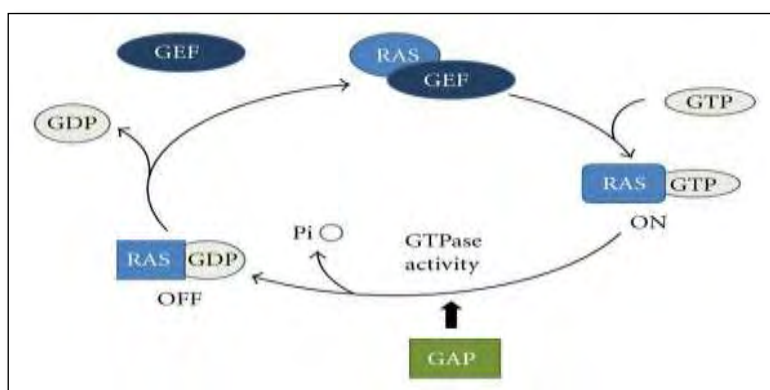
1.3.2. Πρωτεΐνες RAS

Η ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων χρησιμοποιεί κεντρικούς σταθμούς διακόπτες που λαμβάνουν, διαμορφώνουν και διαβιβάζουν τα σήματα. Οι πρωτεΐνες Ras αποτελούν ένα σταθμό-διακόπτη ιδιαίτερης σπουδαιότητας για τις διαδικασίες αύξησης και διαφοροποίησης. Επεξεργάζονται τα σήματα που παραλαμβάνουν από υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης και από υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες, και τα προωθούν στο εσωτερικό του κυττάρου (Mendoza et al., 2011).

Τα θηλαστικά έχουν τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά γονίδια Ras: *H(arvey)-ras*, *Ki(rsten)-rasA*, *Ki-rasB* και *N(euroblastoma)-ras* γονίδιο. Καθένα από αυτά τα γονίδια μπορεί να μετατραπεί σε ογκογόνο από μία μετάλλαξη. Επίσης, τα τέσσερα αυτά γονίδια έχουν στενή συγγένεια μεταξύ τους και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν είναι όλες πρωτεΐνες Ras. Η πρωτεΐνη Ras είναι μία μονομερής GTPάση μεγέθους 21 kDa και τα μέλη της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών Ras είναι ρυθμιστικές GTPάσες 16-25 kDa, οι οποίες είναι ενεργές ως μονομερή. Όλα αυτά τα μέλη μπορούν να υπάρξουν σε μία ανενεργό μορφή Ras.GDP και μία ενεργό Ras.GTP. Στη GTP-συνδεδεμένη κατάσταση, οι Ras αλληλεπιδρούν με τους επόμενους στόχους τους τελεστές των Ras και τους ενεργοποιούν. Οι τελεστές επικοινωνούν, στη συνέχεια, με άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες τοποθετημένες παρακάτω στη σηματοδοτική αλυσίδα. Η σύνδεση των τελεστών στη πρωτεΐνη Ras τερματίζεται με

την υδρόλυση του GTP σε GDP. Μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13, και 61 των RAS γονιδίων, επηρεάζουν τη δραστικότητα GTPάσης με αποτέλεσμα μία ιδιοσυστατικά ενεργοποιημένη κατάσταση (Mendoza et al., 2011).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση μικρών GTPασών στα κύτταρα, είναι η αλληλεπίδρασή τους με μόρια, τα οποία επηρεάζουν τον κύκλο GTP/GDP (Εικόνα 10). Έτσι, λοιπόν, ο παράγοντας GEF (guanine nucleotide exchange factor), διευκολύνει την ανταλλαγή του GDP από το GTP, την απομάκρυνση δηλαδή του GDP από τη πρωτεΐνη G και τη δέσμευση στη θέση του, του GTP. Από την άλλη πλευρά, ο παράγοντας GAP (GTPase-activating protein), καταλύει την υδρόλυση το GTP, αυξάνοντας με λίγα λόγια το ρυθμό της υδρόλυσης (Sundaram, 2006).



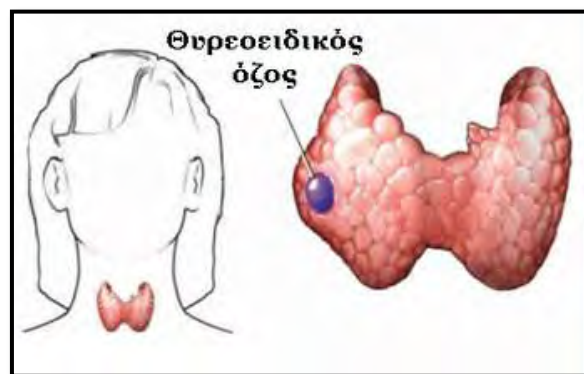
Εικόνα 10: Οι πρωτεΐνες Ras στην ενεργή και στην ανενεργή τους μορφή (Worm Book, http://www.wormbook.org/chapters/www_RTKRasMAPKsignaling/RTKRasMAPKsignaling.html).

Το πρώτο γονίδιο της G-πρωτεΐνης που ανακαλύφθηκε ήταν το γονίδιο ras (rat sarcoma), το οποίο ανακαλύφθηκε το 1978 σαν ογκογονίδιο, υπεύθυνο για την καρκινογόνο δράση των ρετροϊών Harvey και Kristen, που προκαλούν σάρκωμα στα θηλαστικά. Ο ιός Harvey (Ha-MSV: murine sarcoma virus) ανακαλύφθηκε το 1964 από την Jennifer Harvey, και ο ιός Kristen (Ki-MSV) από τον Werner Kristen, το 1967 (Chang et al., 1982).

Το 1982, από τρία διαφορετικά εργαστήρια στο Harvard, βρέθηκαν σε ανθρώπινους όγκους ογκογονίδια H-ras και K-ras, ανάλογα των ιικών. Η μοριακή κλωνοποίηση των φυσιολογικών και των ογκογόνων ανθρώπινων H-ras γονιδίων έδειξε ότι οι λειτουργικές τους διαφορές ήταν αποτέλεσμα μιας μόνο σημειακής μετάλλαξης (Gly12), η οποία καθιστούσε τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Ras ανίκανη να υδrolύσει το GTP, και συνεπώς βρισκόταν σε υπερενεργή κατάσταση. Το 1983, αναγνωρίστηκε ένα τρίτο ανθρώπινο ογκογονίδιο ras, το οποίο ονομάστηκε N-ras, καθώς απομονώθηκε από όγκους ανθρώπινου νευροβλαστώματος (Marshall et al. 1982; Hall et al. 1983).

1.3.3. Διάγνωση και θεραπεία του θυρεοειδούς καρκίνου

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς εμφανίζεται συνήθως με την μορφή ψυχρού όζου. Η συχνότητα του καρκίνου σε ψυχρούς όζους εκτιμάται περίπου στο 12-15% και είναι υψηλότερη σε άτομα κάτω των 40 ετών. Ο όζος είναι μια υποστρόγγυλη εντοπισμένη διόγκωση στο παρέγχυμα του θυρεοειδούς αδένος (Εικόνα 11). Κάποιες φορές είναι επιφανειακός και γίνεται αντιληπτός εξωτερικά με την ψηλάφηση και άλλες φορές ανακαλύπτεται τυχαία στα πλαίσια απεικονιστικού ή λειτουργικού ελέγχου. Οι όζοι χαρακτηρίζονται ως ψυχροί ή θερμοί ανάλογα με το πως εμφανίζονται στο σπινθηρογράφημα. Ως θερμοί όζοι ονομάζονται αυτοί που προσλαμβάνουν στο σπινθηρογράφημα, δηλαδή υπερλειτουργούν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα θερμού όζου είναι το τοξικό αδένωμα, ένας καλοήθης όγκος που όμως παράγει θυροξίνη ανεξέλεγκτα. Οι θερμοί όζοι είναι συνήθως καλοήθεις, ενώ στους ψυχρούς υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό υποψία κακοήθειας (Cooper et al., 2009). Σε περιπτώσεις κλινικής αμφιβολίας είναι πολύ χρήσιμη η διενέργεια βιοψίας δια λεπτής βελόνης (Fine Needle Aspiration Biopsy –FNAB), κατά την οποία αναρροφάται ένα ιστοτεμάχιο από την βλάβη και αποστέλλεται για κυτταρολογική εξέταση.



Εικόνα 11: Απεικόνιση μορφολογίας οζιδίου στον θυρεοειδή αδένα (<http://www.surgical-treatment.gr/Surgicaldiseases/Thyroid/ozoi-thureoeidous/>).

Στην περίπτωση που θα διαγνωσθεί κακοήθεια ή ο όζος προκαλεί πιεστικά φαινόμενα, πρέπει να αποφασιστεί η χειρουργική αφαίρεσή του. Ανάλογα τους μεγέθους και της θέσης του όζου εκτελείται η ενδεικνυόμενη θυρεοειδεκτομή μέσω μιας μικρής εγκάρσιας τομής λίγων (5-7) εκατοστών. Θεραπευτικά, η αντιμετώπιση του καρκίνου του θυρεοειδούς επιτυγχάνεται με τα ακόλουθα στάδια:

- ✓ χειρουργικά (θυρεοειδεκτομή)
- ✓ την χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών
- ✓ την χορήγηση θεραπευτικού ραδιενεργού ιωδίου (^{131}I)
- ✓ και την μακροχρόνια παρακολούθηση (μέτρηση θυρεοσφαιρίνης, υπέρηχος).

Σε περίπτωση διάγνωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς, μετά από κυτταρολογική εξέταση με βιοψία λεπτής βελόνης, ακολουθεί η ολική θυρεοειδεκτομή, ανεξάρτητα από το κλινικό στάδιο του όγκου. Η ολική αφαίρεση του αδένα επιβάλλεται,

εξαιτίας της κοινής λεμφικής παροχέτευσης των δύο λοβών του αδένα, που δεν αποκλείει την εξάπλωση του καρκινώματος (Xing *et al.*, 2013). Επιπλέον, από τη στιγμή που επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της κακοήθειας, ο ασθενής μπαίνει σε αγωγή υποκατάστασης με τριιωδοθυρονίνη (T3) ή με θυροξίνη (T4) (Xing *et al.*, 2013). Πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι ο θεράπων ιατρός είναι ο ενδοκρινολόγος, που καθορίζει την ενδεδειγμένη θεραπευτική προσέγγιση ανάλογα με την περίπτωση. Κατά την θεραπευτική χορήγηση του ^{131}I , προηγείται ο έλεγχος των θυρεοειδών ορμονών και ο σπινθηρογραφικός έλεγχος του τραχήλου για την εκτίμηση του θυρεοειδικού υπολείμματος (Thyroid uptake). Πραγματοποιείται συνηθέστερα με πολύ μικρή δόση ^{131}I και σπανιότερα με ^{123}I . Ο συνδυασμός του αποτελέσματος του σπινθηρογραφήματος του τραχήλου με τα ευρήματα της κυτταρολογικής εξέτασης έχουν την δυνατότητα να καθορίσουν την θεραπευτική δόση του ^{131}I . Μετά τη λήψη του θεραπευτικού ιωδίου, ακολουθεί η νοσηλεία του ασθενούς σε ειδική κλινική, προκειμένου να επιτευχθεί η ακτινοπροστασία της οικογένειάς του. Το ιώδιο θα καταστρέψει ανώδυνα τον υπολειμματικό ιστό, θα ελαχιστοποιήσει τον κίνδυνο υποτροπής και θα καταστρέψει τυχόν μεταστάσεις (λεμφαδενικές ή άλλες).

Ο καλά διαφοροποιημένος καρκίνος του θυρεοειδούς με την χειρουργική επέμβαση και με την χορήγηση του θεραπευτικού ^{131}I έχει άριστα αποτελέσματα. Το ποσοστό ίασης αγγίζει το ποσοστό του 95-97% των ασθενών. Είναι λοιπόν απαραίτητο ανάμεσα στους προληπτικούς ελέγχους που πραγματοποιούνται ετησίως, να συμπεριλαμβάνεται και το υπερηχογράφημα του θυρεοειδούς, ιδιαίτερα στα άτομα που έχουν επιβαρημένο ιστορικό.

1.3.4. Μοριακή διάγνωση του θυρεοειδούς καρκίνου

1.3.4.1. Γενικά

Η ανάπτυξη κατάλληλων μοριακών δεικτών, οι οποίοι να μπορούν να υποδείξουν την κατεύθυνση της χειρουργικής επέμβασης ή της απλής παρακολούθησης για άτομα με απροσδιόριστη κυτταρολογία των δειγμάτων, αποτελεί την κορυφαία μέχρι στιγμής προσπάθεια που γίνεται στο πεδίο του καρκίνου του θυρεοειδούς. Αρκετοί μοριακοί προγνωστικοί δείκτες του καρκίνου του θυρεοειδούς, και ιδιαίτερα οι γενετικοί δείκτες, είναι πολλά υποσχόμενοι. Μερικοί από αυτούς απαντώνται μόνο στον χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο ή στον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 και ALK. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες, ελέγχοντας την επιθετικότητα του θυρεοειδούς καρκινώματος (Xing *et al.*, 2013).

Γενετικά μονοπάτια, όπως εκείνα που ενισχύουν τη λειτουργία των γονιδίων ERK ή οι μεταλλάξεις BRAF, οδηγούν σε μία συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, ενώ παράλληλα και το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3-AKT, συμβάλλουν εξίσου στη δημιουργία θυρεοειδικών όγκων (Xing, 2013, Liu *et al.*, 2008). Η παραπάνω διαπίστωση προτείνει, πως τέτοια γενετικά μονοπάτια αποτελούν τους

‘οδηγούς’ στην ανάπτυξη του καρκίνου του θυρεοειδούς και ίσως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σκόπιμα για την πρόγνωση αυτού (Xing *et al.*, 2013).

Η μετάλλαξη BRAF^{V600E} είναι ένας καινοτόμος προγνωστικός δείκτης που χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση του θηλώδους καρκινώματος. Κατά συνέπεια, προσθέτει μία νέα διάσταση στην αξιολόγηση των ασθενών που κινδυνεύουν από την πιο κοινή μορφή καρκίνου του θυρεοειδούς (Xing *et al.*, 2005). Η αξία του ως προγνωστικός δείκτης ενισχύεται από το γεγονός ότι μπορεί να καθοριστεί προεγχειρητικά σε κυτταρολογικά δείγματα που έχουν συλλεχθεί από τα οζίδια του θυρεοειδούς αδένα, σε αντίθεση με τα παθολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων των υποτύπων με ιστολογική διαμόρφωση θηλώδους καρκίνου, που χρησιμοποιούνται σήμερα για την πρόβλεψη της μετεγχειρητικής επικινδυνότητας του καρκίνου. Ο χαρακτηρισμός της μετάλλαξης BRAF^{V600E} μπορεί να βοηθήσει στη βελτιστοποίηση τόσο της αρχικής θεραπείας όσο και στη μακροπρόθεσμη παρακολούθηση υποτροπιασμού της νόσου σε ασθενείς με θηλώδη θυρεοειδή καρκίνο.

Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην εκτίμηση αυτών των μοριακών δεικτών σε δείγματα με απροσδιόριστη κυτταρολογία. Οι πιο σημαντικές μετρήσεις για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών αποτελούν η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία. Η ευαισθησία και η αρνητική προγνωστική αξία θεωρούνται συμπληρωματικές μετρήσεις, και είναι ενδεικτικές του γεγονότος ότι επιτρέπουν στον γιατρό να αναβάλει τη χειρουργική επέμβαση σε ασθενή με ασαφή κυτταρολογική διάγνωση. Η εξειδίκευση και η θετική προγνωστική αξία είναι συμπληρωματικές ενώ παράλληλα υποδεικνύουν ότι ένας ασθενής με ασαφή κυτταρολογική εικόνα πρέπει να προχωρήσει σε χειρουργική επέμβαση. Οι μοριακοί δείκτες με την υψηλότερη ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία είναι εκείνοι που μάλλον βρίσκονται πίσω από πολλούς θυρεοειδικούς καρκίνους. Η προγνωστική χρησιμότητα αυτών των γενετικών δεικτών είναι πολλά υποσχόμενη αλλά παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη (Xing *et al.*, 2013). Μελλοντικά, η αναγνώριση νέων μοριακών αλλαγών που οδηγούν σε καρκίνο του θυρεοειδούς και η ανάπτυξη πιο συγκεκριμένων και αποτελεσματικών θεραπειών μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή κατάλληλων, πιο εξατομικευμένων θεραπειών για τους ασθενείς.

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς σχετίζεται με τις μεταλλάξεις των γονιδίων BRAF και RAS, καθώς επίσης και με τις αναδιατάξεις RET/PTC και TRK, συμβάλλοντας το καθένα από αυτά στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών (Nikiforov, 2010). Αντίθετα, ο θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς είναι γνωστό πως σχετίζεται με τις μεταλλάξεις των RAS γονιδίων και με τις ανακατατάξεις PAX8/PPARγ. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι αυτές οι μεταλλάξεις είναι αμοιβαία αποκλειόμενες.

1.3.4.2. Μεταλλάξεις BRAF

Ο καλύτερα μελετημένος μοριακός δείκτης είναι εκείνος που σχετίζεται με τη μετάλλαξη του γονιδίου BRAF. Το γονίδιο BRAF κωδικοποιεί μία κινάση σερίνης-θρεονίνης, η οποία ανήκει στην οικογένεια των RAF πρωτεϊνών και αποτελούν τους ενδοκυτταρικούς τελεστές του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών. Η ενεργοποίησή της πυροδοτείται από τη πρόσδεση της RAS πρωτεΐνης καθώς και από τη δέσμευση του αυξητικού παράγοντα στον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης, με τελικό αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση άλλων στόχων κατά μήκος του καταρράκτη των MAP κινασών (Nikiforov, 2010).

Οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF είναι οι πιο κοινές γενετικές μεταλλάξεις που είναι γνωστές για τη πρόκληση του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς σε ποσοστό 40-45% (Kimura et al., 2003; Cohen et al., 2003). Οι παραπάνω μεταλλάξεις εντοπίζονται στο νουκλεοτίδιο 1799 και οδηγούν σε αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη σε γλουταμίνη στο κωδικόνιο 600 (BRAF^{V600E}) (Xing, 2005; Ciampi & Nikiforov, 2005). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε μία συνεχή δραστηριοποίηση της κινάσης BRAF και σε μία χρόνια διέγερση του μονοπατιού των MAPκινασών, δίνοντας γένεση στην ανάπτυξη θυρεοειδικών όγκων (Wan 2004; Knauf et al., 2005).

Η μετάλλαξη BRAF^{V600E} τυπικά εντοπίζεται στον κλασικό θηλώδη καρκίνο αλλά σπάνια στο θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης (Adeniran et al. 2006; Xing 2008). Επιπλέον, η μετάλλαξη BRAF^{V600E} είναι δυνατόν να ανιχνευθεί στα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και στα αναπλαστικά καρκινώματα του θυρεοειδούς. Εν αντιθέσει με τα παραπάνω, η μετάλλαξη BRAF^{V600E} δεν έχει βρεθεί σε θυλακιώδη καρκινώματα και καλοήθεις όγκους του θυρεοειδούς και ως εκ τούτου η μετάλλαξη αυτή αποτελεί έναν αρκετά ειδικό δείκτη για τον θηλώδη καρκίνο και τους υποτύπους του (Xing, 2005).

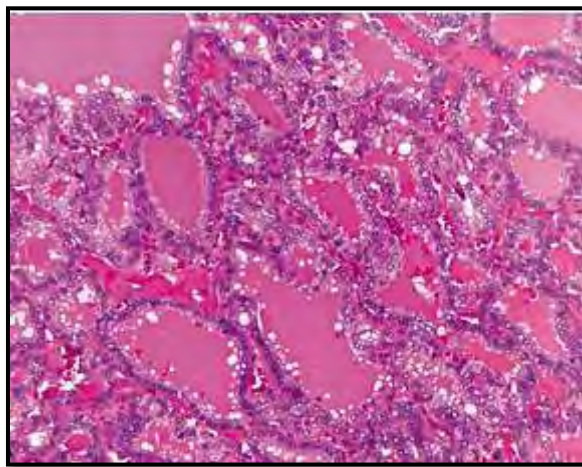
Περίληπτικά, η μετάλλαξη BRAF^{V600E} είναι πιο συχνά παρούσα στον θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (PTC), συσχετίζεται με έναν έντονα επιθετικό φαινότυπο και με έναν αυξημένο κίνδυνο υποτροπιασμού της ασθένειας, σε άτομα που πάσχουν από PTC. Δοκιμές σε αυτές τις μεταλλάξεις μπορούν να χρησιμεύσουν σε μία αρχική θεραπεία και στη περαιτέρω παρακολούθηση της νόσου (Kebebew et al., 2007).

1.3.4.3. Μεταλλάξεις RAS

Η οικογένεια των γονιδίων RAS περιλαμβάνει τα γονίδια HRAS, KRAS και NRAS. Οι σημειακές μεταλλάξεις στις χαρακτηριστικές επικράτειες των γονιδίων RAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) είναι ένα εξαιρετικά συχνό φαινόμενο που παρατηρείται στους διάφορους ανθρώπινους όγκους, η ενεργοποίηση των οποίων σηματοδοτείται μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών, του μονοπατιού PI3/AKT, καθώς και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Παρ' όλο που στους περισσότερους τύπους καρκίνου κυριαρχούν οι μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS στα κωδικόνια 12

και 13, στον θυρεοειδή καρκίνο η πιο συχνή μετάλλαξη αφορά το κωδικόνιο 61 των γονιδίων NRAS και HRAS (Nikiforov, 2010).

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS εντοπίζονται σε ποικίλη συχνότητα σε όλους τους τύπους καρκίνου, που προέρχονται από τα καλώς διαφοροποιημένα θυλακιώδη κύτταρα. Στον θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς, οι μεταλλάξεις RAS είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία όγκων σε ποσοστό 10-20% (Namba *et al.*, 1990; Vasko *et al.*, 2004). Πρακτικά, όλα τα θηλώδη καρκινώματα, που φέρουν μία μετάλλαξη RAS, αποτελούν τη θυλακιώδη παραλλαγή (Εικόνα 12) (Adeniran *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2003). Επίσης μεταλλάξεις των γονιδίων RAS μπορούν, να εντοπιστούν στο 40-50% του κλασικού θυλακιώδους τύπου (FTC) και στο 20-40% του θυλακιώδους αδενώματος (FTA) (Namba *et al.*, 1990).



Εικόνα 12: Τα περισσότερα θηλώδη καρκινώματα που φέρουν μία μετάλλαξη σε γονίδιο RAS είναι θυλακιώδεις παραλλαγές (Nikiforov, 2010).

Πολλές μεταλλάξεις έχουν δείξει μία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις μεταλλάξεις των γονιδίων RAS και τη μεταστατική συμπεριφορά των θηλωδών και των θυλακιωδών καρκινωμάτων, ιδίως όσον αφορά τις μεταστάσεις στα οστά. Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις RAS συχνά εντοπίζονται σε ενθυλακωμένους τύπους της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκίνου (Zhu *et al.* 2003; Liu *et al.* 2006). Επομένως, είναι πιθανόν οι μεταλλάξεις RAS να αποτελούν έναν σημαντικό δείκτη των καλά διαφοροποιημένων καρκίνων του θυρεοειδούς, οι οποίοι έχουν την τάση να προκαλούν μετάσταση και να αποδιαφοροποιούνται. Παρόλο που οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες σε όλους τους καρκίνους του θυρεοειδούς είναι σημαντικές στην ταυτοποίηση της θυλακιώδους παραλλαγής του θηλώδους καρκινώματος, που είναι δύσκολο να ταυτοποιηθεί μετά από κυτταρολογική εξέταση FNA (Fine Needle Aspiration) (Nikiforov, 2010).

1.3.4.4. Αναδιατάξεις RET/PTC

Το πρωτο-ογκογονίδιο RET κωδικοποιεί έναν μεμβρανικό υποδοχέα κινάσης-τυροσίνης. Το γονίδιο RET εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα παραθυλακιώδη κύτταρα ή κύτταρα C αλλά όχι στα θυλακιώδη κύτταρα, όπου μπορεί να ενεργοποιηθεί με μία χρωμοσωμική αναδιάταξη, γνωστή ως αναδιάταξη RET/PTC. Η αναδιάταξη είναι αποτέλεσμα της ένωσης του τμήματος του γονιδίου RET που κωδικοποιεί τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης και διάφορων μη συγγενικών γονιδίων (Nikiforov, 2010). Έχουν αναφερθεί έντεκα τύποι αναδιάταξης RET/PTC, καθένας από τους οποίους έχει σχηματιστεί από τη συγχώνευση του RET με διαφορετικό γονίδιο (Nikiforov, 2002). Οι δύο πιο συνήθεις τύποι αναδιάταξης είναι οι RET/PTC1 και RET/PTC3, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό αναδιατάξεων στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Ο τύπος RET/PTC1 σχηματίζεται μετά από σύντηξη με το γονίδιο CCDC6 (H4), ενώ ο τύπος RET/PTC3 μετά από σύντηξη με το γονίδιο NCOA4 (ELE1) (Grieco et al., 1990; Santoro et al., 1994). Όλες οι συντήξεις περιέχουν την άθικτη επικράτεια της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα RET, η οποία επιτρέπει στην πρωτεΐνη RET να ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι.

Μολονότι οι αναδιατάξεις RET/PTC έχουν ανιχνευθεί σε ορισμένα αδενώματα θεωρούνται αρκετά ειδικές για τα θηλώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς (Nikiforov, 2010). Τα θηλώδη καρκινώματα με αναδιατάξεις RET/PTC είναι τυπικά παρόντα σε νεαρές ηλικίες και χαρακτηρίζονται από την κλασική θηλώδη ιστολογία και μία χαρακτηριστική μετάσταση στη λέμφο (Adeniran et al., 2006). Σε δείγματα FNA, η ανίχνευση των RET/PTC μπορεί να βελτιώσει την προεγχειρητική διάγνωση των όζων, ιδιαίτερα σε δείγματα απροσδιόριστης ιστολογίας ή σε δείγματα με περιορισμένη ποσότητα κυττάρων για κυτταρολογική εξέταση (Salvatore et al., 2004).

1.3.4.5. Αναδιατάξεις PAX8/PPARγ

Η αναδιάταξη PAX8/PPARγ είναι αποτέλεσμα της μετάθεσης t(2;3)(q13;p25), που οδηγεί στη σύντηξη ανάμεσα στο γονίδιο PAX8, το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα και στο γονίδιο PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor), που κωδικοποιεί ένα πυρηνικό υποδοχέα (Kroll et al., 2000). Η αναδιάταξη PAX8/PPARγ εντοπίζεται στο 30-40% του κλασικού τύπου του θυλακιώδους καρκινώματος και σε χαμηλότερη συχνότητα σε ογκοκυτταρικά καρκινώματα (Nikiforova et al., 2003; French et al., 2003; Dwight et al., 2003). Επίσης, αυτή η αναδιάταξη εντοπίζεται, στον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς με μία αναφερόμενη συχνότητα του 5% (French et al., 2003; Nikiforova et al., 2002), παρόλο που έχει αναφερθεί και μια μελέτη με συχνότητα που ανέρχεται στο 38% (Castro et al., 2006). Επιπλέον, αυτή η μετάλλαξη μπορεί να εντοπιστεί σε μικρό ποσοστό (2%-13%) στα θυλακιώδη αδενώματα (Nikiforova et al., 2003; Dwight et al., 2003; Marques et al., 2002). Τέλος, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι αναδιατάξεις PAX8/PPARγ και οι μεταλλάξεις των γονιδίων RAS, σπάνια συνυπάρχουν στον ίδιο τύπο καρκίνου, υποδηλώνοντας ότι τα θυλακιώδη καρκινώματα ίσως αναπτύσσονται μέσω τουλάχιστον δύο διακριτών

μοριακών μονοπατιών, όπου το έναυσμα δίνεται είτε από την αναδιάταξη *PAX8/PPARγ* είτε από τη μετάλλαξη *RAS* (*Nikiforova et al., 2003*).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της συσχέτισης των μεταλλάξεων στα γονίδια BRAF (κωδικόνιο 600) και KRAS (κωδικόνια 12,13 και 61) με τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος, στον ελληνικό πληθυσμό.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν συνολικά 18 ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο του θυρεοειδούς. Τα δείγματα προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Στρατιωτικού Νοσοκομείου ΝΙΜΙΤΣ στην Αθήνα (Πίνακας 2). Τα δείγματα είναι βιοψίες ιστού και περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς. Οι τύποι των ιστών με καρκίνο του θυρεοειδούς που εξετάστηκαν ήταν οι ακόλουθοι: 10 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα (papillary thyroid carcinoma, PTC), 7 ιστοί με θηλώδες καρκίνωμα θυλακιδώδους προτύπου ανάπτυξης (follicular variant of papillary thyroid carcinoma, FVPTC), και 1 ιστός με θυλακιδώδες καρκίνωμα (follicular thyroid carcinoma, FTC).

Πίνακας 2: Στοιχεία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Τύπος Καρκίνου	Αριθμός Δειγμάτων
Θηλώδες καρκίνωμα	10
Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιδώδες πρότυπο ανάπτυξης	7
Θυλακιδώδες καρκίνωμα	1

Υποσημείωση: Στη παρούσα μελέτη όλοι οι ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν γένους θηλυκού και οι ηλικίες τους κυμαίνονταν από 27-74 ετών (Μ.Ο. : $\pm 45,72$).

2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της εργαστηριακής διαδικασίας ήταν υψηλής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες **Sigma-Aldrich**, **AppliChem Panreac ITW Companies**, **NEW ENGLAND Biolabs inc**, **QIAGEN**, **Macherey-Nagel**, **Kapa Biosystems**. Πιο συγκεκριμένα :

- **Sigma-Aldrich**
Αιθανόλη (καθαρότητας $\geq 99.8\%$, αριθμός καταλόγου 32221)
Ξυλένιο (αριθμός καταλόγου 33817)
- **AppliChem Panreac ITW Companies**
Αγαρόζη (Agarose Low EEO –Agarose standard, αριθμός καταλόγου A2114)
Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml - αριθμός καταλόγου A1152)

- **NEW ENGLAND Biolabs® inc**
Low Molecular DNA Ladder (αριθμός καταλόγου N3233S)
- **QIAGEN**
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (αριθμός καταλόγου 56404)
- **Macherey-Nagel**
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (αριθμός καταλόγου REF 740609.250)
- **Kapa Biosystems**
Πολυμεράση Kapa Taq (5 U/μl) (αριθμός καταλόγου KE1000)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Απομόνωση DNA από βιοψίες ιστών

2.2.1.1. Αντιδραστήρια - Διαλύματα

Όλα τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία απομόνωσης DNA από βιοψία ιστού σταθεροποιημένου με φορμαλίνη και εγκλεισμένου σε παραφίνη (Formalin – Fixed Paraffin Empted, FFPE) παρουσιάζονται λεπτομερώς παρακάτω :

- Ξυλένιο (Sigma-Aldrich)
- Αιθανόλη (Sigma-Aldrich, καθαρότητας $\geq 99.8\%$)
- Kit **QIAamp DNA FFPE Tissue** (for purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissues) (εταιρία **QIAGEN**)

Το kit **QIAamp DNA FFPE Tissue** περιείχε τα εξής αντιδραστήρια:

- Διάλυμα Πρωτεΐνης K (20 mg/ml)
- Ρυθμιστικά διαλύματα Buffer ATL, Buffer AL (Lysis Buffer), Wash Buffer AW1 (Wash Buffer 1), Wash Buffer AW2 (Wash Buffer 2), Elution Buffer ATE (Elution Buffer)
- QIAamp MinElute κολώνες και σωληνάρια συλλογής χωρητικότητας 2 ml

Τα διαλύματα AW1 και AW2 παρασκευάστηκαν ως εξής:

- *AW1= Σε 19 ml διαλύματος AW1 του kit προστέθηκαν 25 ml αιθανόλης (καθαρότητας $\geq 99.8\%$).
- *AW2= Σε 13 ml διαλύματος AW1 του kit προστέθηκαν 30 ml αιθανόλης (καθαρότητας $\geq 99.8\%$).

2.2.1.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία: Αρχικά, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού αφαιρέθηκε η περίσσεια ποσότητα παραφίνης από κάθε δείγμα. Έπειτα, προκειμένου να επιτευχθεί η αποτελεσματική απομόνωση DNA, ο κάθε ιστός τεμαχίστηκε σε μία έως δύο τομές (ανάλογα με τη ποσότητα ιστού σε κάθε δείγμα) πάχους 5-10 μm . Εάν η επιφάνεια είχε εκτεθεί στον αέρα αφαιρούνταν οι πρώτες δύο τομές. Στη συνέχεια, οι τεμαχισμένοι αυτοί ιστοί τοποθετήθηκαν σε σωλήνα errendorf του 1,5 ml, ακολούθησε η προσθήκη 1 ml ξυλένιου και μετέπειτα ισχυρή ανάδευση με τη χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα. Η διαδικασία συνεχίστηκε με φυγοκέντρηση των δειγμάτων (**Thermo ELECTRON CORPORATION, HERAEUS PICO17 Centrifuge**) σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, η παραφίνη διαλύθηκε στο ξυλένιο και ήταν ευκολότερη η απομάκρυνσή της από τον ιστό του δείγματος. Το υπερκείμενο, μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, αφαιρέθηκε πολύ προσεκτικά με τη χρήση πιπέτας, για να αποφευχθεί η διατάραξη του ιζήματος και να παραμείνει αναλλοίωτο. Στη συνέχεια προστέθηκε στο ίζημα 1 ml αιθανόλης (καθαρότητας $\geq 99.8\%$) με στόχο την απομάκρυνση της περίσσειας ξυλένιου. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση του υπερκειμένου και το κάθε δείγμα (ίζημα) επώαστηκε, με ανοιχτό καπάκι, σε επωαστικό κλίβανο 37 °C για περίπου 15-20 λεπτά, μέχρι να εξατμιστούν πλήρως τα υπολείμματα αιθανόλης. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε πλήρως σε 180 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ATL (**Buffer ATL**), πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 μl **πρωτεΐνης K** (20 mg/ml) και έπειτα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ισχυρή ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα με τη χρήση vortex. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων, σε ένα θερμικό περιστρεφόμενο επωαστήρα (rotating incubator) με εσωτερική θερμοκρασία 56 °C για τουλάχιστον 2 ½ ώρες ή για περισσότερο χρονικό διάστημα, μέχρι να επέλθει η πλήρης λύση του κάθε δείγματος. Συγκεκριμένα, κάποια δείγματα χρειάστηκε να παραμείνουν στο στάδιο της επώασης καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (24 ώρες, overnight) ενώ για τα περισσότερα από αυτά χρειάστηκε επιπλέον προσθήκη 10 έως 20 μl πρωτεΐνης K, εφόσον το δείγμα δεν είχε λυθεί πλήρως μετά από μία overnight επώαση (24 ώρες) στους 56 °C. Μετά την πλήρη λύση, τα δείγματα επωάστηκαν στους 90 °C για χρονικό διάστημα 1 ώρας σε μπλοκ θέρμανσης (heating block). Ύστερα από μία σύντομη φυγοκέντρηση, για τη συλλογή όλων των σταγόνων από τα τοιχώματα στον πάτο του σωλήνα, προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα AL (**Buffer AL**) και 200 μl **αιθανόλης**. Ακολούθησε καλή ανάμειξη του δείγματος με τη χρήση vortex, πριν και μετά από τη κάθε προσθήκη. Έπειτα, από μία σύντομη φυγοκέντρηση, όλο το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε προσεκτικά στην **ειδική στήλη έκλουσης QIAamp MinElute**, η οποία εισήχθη εκ των προτέρων σε ειδικό σωλήνα συλλογής των 2 ml (collection tube). Η επακόλουθη φυγοκέντρηση της ειδικής στήλης, σε ταχύτητα 6,000 x g για 1 λεπτό, αποσκοπούσε στη δέσμευση του γενωμικού DNA στη μεμβράνη της στήλης με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προσμίξεων διαμέσου της μεμβράνης, που συλλέγονταν στο σωλήνα συλλογής. Μετά τη φυγοκέντρηση, η ειδική στήλη έκλουσης μεταφέρθηκε σε 2 ml νέο σωλήνα διαλογής. Ο περαιτέρω καθαρισμός

του DNA, που είχε δεσμευθεί στη μεμβράνη, επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης στη στήλη 500 µl από τα ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης AW*1 και AW*2 **(Buffer AW*1 και Buffer AW*2)** και ακολούθως, φυγοκέντρωσης σε ταχύτητα 6,000 x g για 1 λεπτό και τελική μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα διαλογής. Απαραίτητο βήμα, αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία της πλύσης του DNA ήταν μία νέα φυγοκέντρωση της στήλης σε πλήρη ταχύτητα (16.600 x g) , για 3 λεπτά, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη και να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη. Έπειτα, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf του 1,5 ml και ακολούθησε το τελικό στάδιο έκλουσης του DNA, κατά το οποίο προστέθηκαν στο κέντρο της μεμβράνης 25 µl ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης ATE (**Buffer ATE**) και η στήλη επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κύριος σκοπός της τελευταίας επώασης ήταν η αύξηση της απόδοσης έκλουσης του DNA. Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας της απομόνωσης περιελάμβανε μία φυγοκέντρωση σε πλήρη ταχύτητα, (16.600 x g) για 1 λεπτό, με σκοπό την τελική έκλυση του DNA από τη στήλη. Το γενωμικό DNA των δειγμάτων αποθηκεύεται και συντηρείται σε ψυγείο στους -20 °C για μετέπειτα μελλοντική χρήση.

2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύματα

Για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- TAE 50X (stock): Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57.1 ml), EDTA (18.6 gr), ddH₂O μέχρι 1 L. pH: 8.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml, αριθμός καταλόγου A1152.
- Χρωστική φόρτωσης διαλύματος (Loading Buffer, 6X): 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (25 mg), 30% w/v Γλυκερόλη (3 ml), ddH₂O (7 ml). Συνολικός όγκος: 10 ml.
- Αγαρόζη: (Agarose Low EEO - Agarose standard, 500 gr, αριθμός καταλόγου A2114).

Μάρτυρας Low Molecular DNA Ladder (500 µg/ml, αριθμός καταλόγου N3233S).

2.2.2.2. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί τη βάση μιας πολύ χρήσιμης μεθοδολογίας για τον καθαρισμό, τον διαχωρισμό και τη ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) καθώς και νουκλεο-πρωτεϊνικών

συμπλόκων, τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, καθίσταται δυνατή η μετακίνησή τους μέσα σε υδάτινα διαλύματα και υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, με διαφορετικές ταχύτητες, και έτσι, είναι εφικτό να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας ταυτόχρονα και τις βιολογικές τους ιδιότητες (Watson *et al.*, 2007).

Όλα αυτά τα βιομόρια φέρουν ομάδες που έχουν τη δυνατότητα ιονισμού και κατ' επέκταση όταν εφαρμοστεί μια διαφορά δυναμικού, διαθέτουν καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να κινούνται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον αρνητικό ή το θετικό πόλο αντίστοιχα, με μία ταχύτητα, η οποία εξαρτάται από το μήκος, το φορτίο, το σχήμα τους καθώς και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τη θερμοκρασία (Lee *et al.*, 2012).

Η αгарόζη εξάγεται με τη μορφή άγαρ, ένα προϊόν που λαμβάνεται από ορισμένα θαλάσσια φύκη και διατίθενται με μορφή σκόνης. Το κύριο συστατικό του άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από διάφορα είδη του είδους Rhodophyceae (*Geldium amansii*, *G. Cartilagineum*), αποτελείται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες D-γαλακτοπυρανόζης και μπορεί να προστεθεί σε οποιοδήποτε θρεπτικό μέσο, σε συγκέντρωση 1 - 2%. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης αποτελεί μια πολύ συχνή μέθοδο ποιοτικής (αλλά και ποσοτικής) ανάλυσης του DNA, όπου γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο (λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων του μορίου) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το βάρος τους (Watson *et al.* 2007).

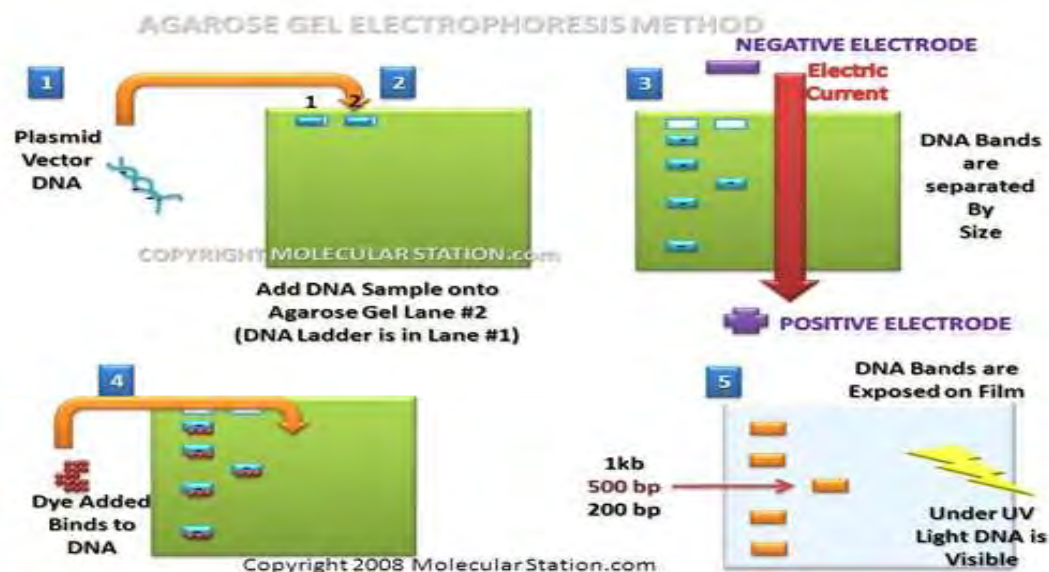
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι η συγκέντρωση του πηκτώματος της αгарόζης καθώς και η στερεοδιάταξη του DNA επηρεάζουν σημαντικά την κινητικότητα των νουκλεϊκών οξέων. Συγκεκριμένα η ποσοστιαία συγκέντρωση του πηκτώματος και η ταχύτητα κίνησης είναι μεγέθη που σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα. Έτσι, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της αгарόζης, μειώνεται η ταχύτητα μετανάστευσης των τμημάτων αλλά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των μικρότερων τμημάτων. Αντίθετα, μειώνοντας τη συγκέντρωση της αгарόζης επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός μεγαλύτερων τμημάτων. Χαρακτηριστικά, ένα πήκτωμα αгарόζης είναι αποτελεσματικό για το διαχωρισμό τμημάτων DNA με μεγέθη από 100 bp έως 25 kb (Lee *et al.*, 2012). Επιπλέον, το DNA μπορεί να λάβει τρεις διαμορφώσεις την υπερελικωμένη διαμόρφωση, στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπαγή του μορφή, την ανοιχτή κυκλική, στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα και την γραμμική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα. Κάτω από τυπικές συνθήκες (πλασμίδιο 3.000-10.000 bp – αгарόζη 1%), η υπερελικωμένη μορφή κινείται ταχύτερα από τη χαλαρή, γιατί είναι πιο συμπιεσμένη και περνά πιο εύκολα μέσα από τα κενά του πολυμερούς (Lee *et al.*, 2012).

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία δημιουργίας ενός πηκτώματος αγαρόζης με ποσοστιαία περιεκτικότητα 2% σε αγαρόζη ήταν η ακόλουθη: αρχικά, ζυγίστηκαν 1,2 gr αγαρόζης, με τη βοήθεια ειδικού ζυγού ακρίβειας και μεταφέρθηκαν σε μία κωνική φιάλη, στην οποία προστέθηκαν 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE (Tris/Acetate/EDTA) 1X.. Προκειμένου να διαλυθεί η αγαρόζη, η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων, για χρονικό διάστημα περίπου 2 λεπτών και παραμένει υγρή σε θερμοκρασία έως 40 °C. Αφού το μείγμα κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολουθεί η προσθήκη 1,8 ml διαλύματος βρωμιούχου αιθίδιο 10 mg/ml (ώστε η τελική συγκέντρωση του EtBr να είναι 0,5 µg/ml). Έπειτα από καλή ανάδευση, το δείγμα μεταφέρθηκε σε ειδικό καλούπι, έτσι ώστε να αποκτήσει το κατάλληλο σχήμα, μέχρι η αγαρόζη να πολυμεριστεί και να πήξει. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί, πως πριν πολυμεριστεί η αγαρόζη, στο καλούπι τοποθετούνται ειδικά χτενάκια, τα οποία βοηθούν στο σχηματισμό των ονομαζόμενων "wells" ή αλλιώς "πηγαδάκια", στα οποία φορτώνονται, στη συνέχεια, τα υπό εξέταση δείγματα. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία ήταν γεμάτη με TAE 1X (παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται η μεταφορά ρεύματος και να διατηρείται το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή).

Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, απαιτείται η ανάμειξη του δείγματος με ένα διάλυμα φόρτωσης – χρωστική ή Loading Buffer. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλη. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι μία χρωστική ιχνηλασιμότητας χαμηλού μοριακού βάρους με αρνητικό φορτίο, η οποία είναι ορατή με φυσικό φως, καθιστώντας τα δείγματα ορατά, γεγονός που διευκολύνει τη τοποθέτησή τους (φόρτωσή τους) στο πήκτωμα ενώ παράλληλα επιτρέπει τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η γλυκερόλη με τη σειρά της, αυξάνει τη πυκνότητα του δείγματος ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή του στο "πηγαδάκι" και να μη διαχυθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Watson *et al.*, 2007). Τέλος, μαζί με τα δείγματα είναι απαραίτητη και η φόρτωση ενός δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (Low Molecular DNA Ladder). Τα μεγέθη των ζωνών που περιέχει είναι γνωστά και σύμφωνα με αυτά και ανάλογα με τη θέση κάθε ζώνης υπολογίζεται το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA (Lee *et al.*, 2012).

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από μια πηγή ηλεκτρικού ρεύματος (τροφοδοτικό), που παρέχει συνεχές ρεύμα, με ρυθμιζόμενη τάση (volts) ή ένταση (mA), και από μια λεκάνη χωρισμένη σε δυο δεξαμενές (λουτρό), που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί τη ροή ηλεκτρικού ρεύματος, ώστε τα μόρια DNA (που είναι αρνητικά φορτισμένα) να μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Καθώς τα διαφορετικά μόρια DNA μετακινούνται, σχηματίζονται χαρακτηριστικές ζώνες (ανάλογα με το μέγεθός τους) περιοχές του πηκτώματος (Watson *et al.*, 2007). Μετά το πέρας της διαδικασίας, η οποία διήρκεσε περίπου 40 λεπτά και με ρυθμιζόμενη τάση στα 90 έως 120 volt, το πήκτωμα αγαρόζης εκτέθηκε σε υπεριώδες φως (UV), ώστε να απεικονιστεί το αποτέλεσμα.



Εικόνα 13 : Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (Gel Electrophoresis, <http://wec4life.wikispaces.com/Gel+Electrophoresis>).

2.2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Αρχή της μεθόδου

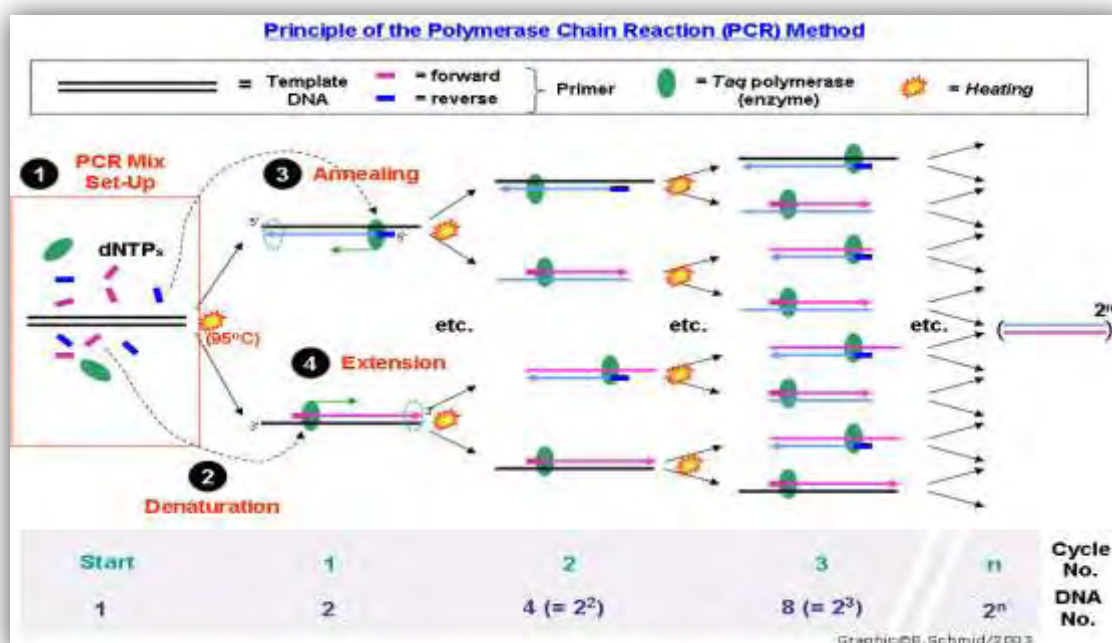
Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του '80 από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Αποτελεί μία γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική, ενώ, παράλληλα, πρόκειται για μία εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο, καθώς έχει δυνατότητα ανίχνευσης μιας αλληλουχίας από ένα μόριο DNA (Li et al., 1990).

Η PCR είναι μία τεχνική που βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό *in vitro* (χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών, όπως η *E. coli* ή ζύμες) μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA (γνωστού ή άγνωστου). Η γρήγορη βελτιστοποίηση της μεθόδου επιτεύχθηκε με τη βοήθεια μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, της **Taq DNA πολυμεράσης**, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Επίσης απαραίτητο συστατικό της PCR αποτελεί η χρήση **δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων** (*primers*) μήκους 18-22 βάσεις, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Συνήθως, απαιτούνται 20-40 θερμοκρασιακές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρία στάδια (Εικόνα 14) :

1. Ένα στάδιο θερμικής αποδιάταξης του DNA – στόχου στους 94-96 °C.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλιωνα μόρια DNA σε μια θερμοκρασία, που εξαρτάται από το μήκος των εκκινητών και την αλληλουχία τους.
3. Πολυμερισμός στους 72 °C.

Τα βήματα αυτά αναλύονται ακολούθως.



Εικόνα 14: Διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (<http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab8-Biol210.htm>).

1. Κατά το στάδιο της αποδιάταξης, πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Για την αποδιάταξη του DNA η θερμοκρασία συνήθως αυξάνεται στους 94 °-96 °C, μία θερμοκρασία, η οποία ευνοεί τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας. Η θερμοκρασία στην οποία το δίκλωνο DNA γίνεται μονόκλωνο, καλείται θερμοκρασία τήξης, T_m (melting temperature). Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη θερμοκρασία τήξεως όπως η περιεκτικότητα του DNA σε G/C και A/T, η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα (κυρίως των ιόντων Mg^{2+} και K^{+}) και το μήκος της αλληλουχίας που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.

2. Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60 °C, με αποτέλεσμα μερική επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων του DNA-στόχου, όπως επίσης και πρόσδεση των εκκινητικών μορίων στις συμπληρωματικές αλληλουχίες. Η θερμοκρασία αυτή είναι γνωστή ως θερμοκρασία επαναδιάταξης, T_a (annealing temperature) και είναι κατά κανόνα 5-10 °C χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξεως, T_m . Αξίζει να αναφερθεί ότι ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Γι' αυτό το λόγο, οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως, T_m .

3. Στο τρίτο στάδιο η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C και μπορεί να αρχίσει η σύνθεση του DNA, με τη δράση της Taq πολυμεράσης, παρουσία ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος και ιόντων Mg^{+} . Σε αυτή τη θερμοκρασία, η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs), ανά δευτερόλεπτο, με προσανατολισμό 5' → 3', τα οποία είναι συμπληρωματικά στο υπόστρωμα. Αφού οι εκκινητές επεκταθούν μερικές βάσεις, τότε κατέχουν μια ισχυρότερη ιονική έλξη προς την ακολουθία-στόχο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα αποδέσμευσης των εκκινητών από την ακολουθία-στόχο. Μετά από κάθε κύκλο, οι πρόσφατα συντιθέμενοι κλώνοι του DNA μπορεί να χρησιμεύσουν ως εκμαγείο στον επόμενο κύκλο. Το κύριο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα του δίκλωνου DNA, του οποίου τα άκρα ορίζονται από τους εκκινητές και το μήκος του από την απόσταση μεταξύ των εκκινητών (Πλαγεράς *et al.*, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον ιδανικό, συνεπάγεται αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αριθμός αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη την ανίχνευση του DNA-στόχου. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2^n όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Στους τελευταίους κύκλους, η αντίδραση φτάνει σε «πλάτο», κυρίως, λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Watson *et al.*, 2007).

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτερες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των 40 °C να λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό.

Τα πλεονεκτήματα της PCR είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA, καθώς και όταν το DNA δεν είναι εξαιρετικής ποιότητας ή καθαρότητας.

Πειραματική διαδικασία

Οι περιοχές των γονιδίων BRAF και KRAS, που ενισχύθηκαν με τη διαδικασία της PCR, ήταν η περιοχή που περιλαμβάνει το κατάλοιπο 600 για το γονίδιο BRAF και οι περιοχές που περιέχουν τα κωδικόνια 12, 13 και 61 για το γονίδιο KRAS. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παραπάνω περιοχών, καθώς και το μέγεθος των ενισχυμένων προϊόντων και οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Αλληλουχίες εκκινητών, μέγεθος ενισχυμένων προϊόντων και οι υπό μελέτη σημειακές μεταλλάξεις για τα γονίδια BRAF και KRAS.

Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητή 5' ->3	Μετάλλαξη	Αμινοξέα
BRAF	For*: CATAATGCTTGCTCTGATAGGAA Rev*: AGTAACTCAGCAGCATCTCAG	Κατάλοιπο 600 (GTG)	Βαλίνη
KRAS	For*: AACCTTATGTGTGACATGTTT Rev*: TCCTGCACCAGTAATATGC	κωδικόνια 12-13 (GGT-GGC)	Γλυκίνη - Γλυκίνη
KRAS	For*: AATCCAGACTGTGTTTCTCC Rev*: TTAAACCCACCTATAATGGTG	κωδικόνιο 61 (CAA)	Γλουταμίνη

*For: (forward primer, Πρόσθιος εκκινητής), Rev: (reverse primer, ανάστροφος εκκινητής).

Οι θερμοκρασιακές εναλλαγές διεξήχθησαν στην ειδική συσκευή Thermo cycling (**SENSQUEST lab cycler**) και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε δίνονται στον Πίνακα 4:

Πίνακας 4: Συνθήκες για την αντίδραση PCR για τους εκκινητές BRAF, KRAS 12/13, KRAS 61.

Στάδιο	primer BRAF		primer KRAS 12/13		primer KRAS 61	
	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	5 min	95 °C	5 min	95 °C	5 min
Αποδιάταξη	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec
Υβριδοποίηση	53 °C	30 sec	51 °C	30 sec	51 °C	30 sec
Επέκταση	72 °C	30 sec	72 °C	30 sec	72 °C	30 sec
Επέκταση	72 °C	5 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min
Αναμονή	4 °C	Until Analysis	4 °C	Until Analysis	4 °C	Until Analysis

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 40 κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης.

Στην παρούσα εργασία η αντίδραση πολυμερισμού, συνήθως πραγματοποιούνταν σε όγκο 20-50 µl σε ειδικό σωληνάριο erppendorf τελικού όγκου 0,2 ml. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της κάθε PCR αγοράστηκαν από την εταιρεία **Kapa Biosystems (KAPA Taq PCR kit)**, όπως φαίνονται και στον Πίνακα 5. Επίσης, σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου, που περιείχε όλα τα συστατικά μιας αντίδρασης PCR, της οποίας το γενωμικό DNA είχε αντικατασταθεί από νερό. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου δεν αναμένεται να δώσει κάποιο προϊόν, καθώς δεν περιέχει DNA για να ενισχυθεί, οπότε αν εμφανιστεί προϊόν στο αρνητικό control, αυτό αποτελεί σημάδι επιμόλυνσης στα αντιδραστήρια της PCR ή μη ειδικής ενίσχυσης του υπό μελέτη γονιδίου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Πίνακας 5: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (µl)
10X PCR Buffer (+ 15 mM Mg²⁺)	1X Buffer + 1,5 mM (Mg ²⁺)	5
Μείγμα dNTPs (10 mM το καθένα)	0,2 mM (το καθένα)	1
10 pmol/µl Εκκινητής Forward	0,5 pmol/µl	2,5
10 pmol/µl Εκκινητής Reverse	0,5 pmol/µl	2,5
Kapa Taq Πολυμεράση (5 U/µl)	0,02 U/µl	0,2
Template DNA	-	4
H₂O	-	34,8
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ		50

Επιλογή εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR

Παρακάτω εικονίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων BRAF και KRAS, και με πράσινο χρώμα επισημαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενώ με μπλε χρώμα σημειώνονται τα υπό μελέτη κωδικόνια.

Γονίδιο BRAF

Πρόσθιος εκκινητής BRAF : CATAATGCTTGCTCTGATAGGAA

Ανάστροφος εκκινητής BRAF : AGTAACTCAGCAGCATCTCAG

Μέγεθος προϊόντος : 244 bps

AATTATAGAAATTAGATCTTACCTAAACTCTT**CATAATGCTTGCTCTGATAGGAA**AATGAGATCTACTGTTTT
 CCTTTACTTACTACACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAC
 A**GTG**AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTG
 AGGCTATTTTCCACTGATTAAATTTTGGCC**CTGAGATTGCTTGCTCTTACT**AGAAAGTCATTGAAGGTCTC

Γονίδιο KRAS

Πρόσθιος εκκινητής KRAS 12/13 : AACCTTATGTGTGACATGTTCC

Ανάστροφος εκκινητής KRAS 12/13 : TCCTGCACCAGTAATATGC

Μέγεθος προϊόντος : 216 bps

GTGTATT**AACCTTATGTGTGACATGTTCT**AATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAAT
GACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT**GGTGGC**GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAG
AATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATAT**GCATATTACTGGTGCAGGA**
CCATTCTTTG

Πρόσθιος εκκινητής KRAS 61 : AATCCAGACTGTGTTTCTCC

Ανάστροφος εκκινητής KRAS 61 : TTAAACCCACCTATAATGGTG

Μέγεθος προϊόντος : 217 bps

CACTGTAAT**AATCCAGACTGTGTTTCTCC**CTTCTCAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAA
CCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGT**CAA**GAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGAC
TGGGGAGGGCTTTCTTGTGTATTGCCATAAATAACTAAATCATTGAAGATATT**CACCATTATAGGTGGGT**
TTAAATTGAATAT

Στη συνέχεια, τα προϊόντα των αντιδράσεων της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης, σύστασης 2%, με σκοπό να επιβεβαιωθεί τόσο η επιτυχία της αντίδρασης PCR, όσο και ότι τα προϊόντα της PCR έχουν το σωστό μέγεθος (244 bps για το BRAF, 216 bps για το KRAS 12/13 και 217 bps για το KRAS 61). Στα «πηγαδάκια» φορτώθηκαν 5 µl από το προϊόν της αντίδρασης PCR μετά από ανάμειξη με 1 µl χρωστικής-διαλύματος φόρτωσης (6X). Στο πήκτωμα, φορτώθηκε και μάρτυρας μοριακού βάρους (Low MW DNA Ladder). Η απεικόνιση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε μετά από την τοποθέτηση του πηκτώματος σε ειδική λάμπα UV.

2.2.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Πρωτόκολλο

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR, είναι σημαντικό, εκ των προτέρων, να επιτευχθεί ο καθαρισμός τους, έτσι ώστε να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα αλάτων, ενζύμων, διμερή εκκινητών που έχουν παραμείνει από τις ενζυματικές αντιδράσεις. Ο καθαρισμός του ενισχυμένου προϊόντος της PCR έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές αναφέρονται στο πρωτόκολλο του **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit** (for DNA, RNA and protein purification) της εταιρίας **MACHEREY – NAGEL**).

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: αρχικά, προσαρμόστηκε ο όγκος των μειγμάτων της αντίδρασης σε 50 µl, με προσθήκη απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος

NTI (**Buffer NTI**). Σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου, η ανάμειξη αναφέρεται σε 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος NTI για κάθε 1 όγκο του δείγματος και, έτσι, στα 50 µl του PCR προϊόντος προστέθηκαν 100 µl διαλύματος NTI. Έπειτα, ακολούθησε η δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της ειδικής στήλης. Για το σκοπό αυτό, τοποθετήθηκε μία στήλη έκλουσης σε κάθε σωλήνα συλλογής των 2 ml (collection tube) και όλη η ποσότητα μείγματος φορτώθηκε προσεκτικά στο κέντρο της μεμβράνης. Μετά από φυγοκέντρηση της στήλης σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα, αφαιρέθηκε το απορρέων υγρό και η στήλη επανατοποθετήθηκε στον ίδιο, αλλά καθαρισμένο σωλήνα συλλογής. Επόμενο βήμα του καθαρισμού ήταν η έκλουση της μεμβράνης πυριτίου (silica membrane). Έτσι, προστέθηκαν στη στήλη 700 µl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (**Buffer NT3**) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11,000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρέθηκε το απορρέων υγρό από το σωλήνα συλλογής. Η διαδικασία έκλουσης της μεμβράνης, πραγματοποιήθηκε και δεύτερη φορά (όπως προαναφέρθηκε), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τελικά η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 11,000 x g για ένα λεπτό, με απώτερο σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης, που περιλαμβάνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα NT3, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε παρεμπόδιση ενζυματικών αντιδράσεων. Για την έκλουση των προϊόντων της PCR η ειδική στήλη τοποθετήθηκε σε νέο erpendorf σωλήνα (χωρητικότητας 1.5 ml) και ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE (**Buffer NE**). Οι όγκοι έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν κυμαίνονταν μεταξύ 15 και 25 µl, ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος PCR της κάθε αντίδρασης, οι οποίοι αποφασίστηκαν ανάλογα με την ένταση της ζώνης του κάθε προϊόντος PCR, όπως αυτή παρουσιαζόταν στην εικόνα που προέκυψε μετά από την ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης. Πραγματοποιήθηκε επώαση του διαλύματος έκλουσης στις στήλες, για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (18°-25 °C) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 11,000 x g για ένα λεπτό. Τέλος, τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2% και διατηρήθηκαν σε καταψύκτη θερμοκρασίας -20 °C μέχρι την αλληλούχισή τους.

Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι για την αποφυγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων της αντίδρασης PCR που μπορεί να επηρεάσουν την μετέπειτα αλληλούχιση, κάποια προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης και μετά την αποκοπή της ζώνης του επιθυμητού μεγέθους καθαρίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές αναφέρονται στο πρωτόκολλο του **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit**.

2.2.5. Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων της PCR

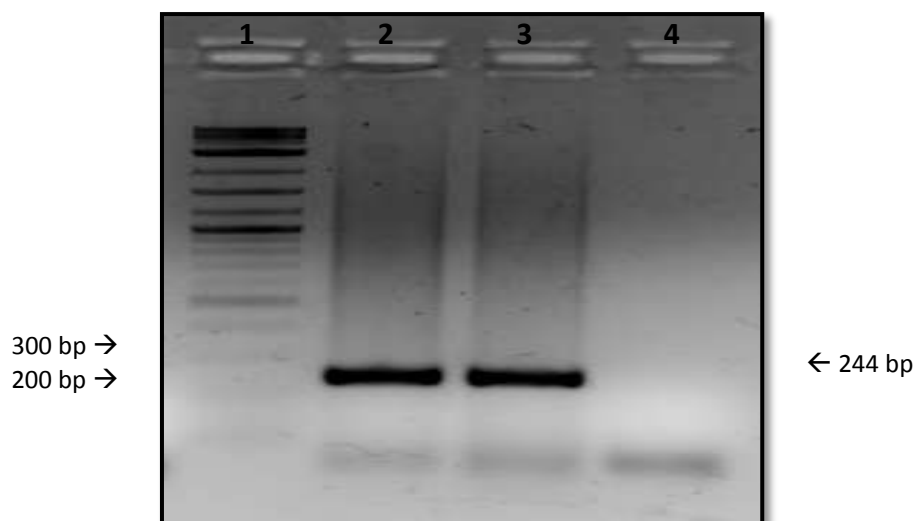
Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR εκτελέστηκε από μία εξειδικευμένη εταιρεία βιοτεχνολογικών και μοριακών τεχνικών με την επωνυμία **CEMIACA** (Cellular and Molecular Immunological Applications) (Λάρισα). Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων στάλθηκαν υπό τη μορφή χρωματογραφημάτων, τα οποία αναλύθηκαν στο εργαστήριο με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος **BioEdit v7.2.5** (developer Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad CA 92008, Last update 12/11/2013, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι πρόσθιοι όσο και οι ανάστροφοι εκκινητές των γονιδίων BRAF και KRAS (KRAS 12/13 και KRAS 61) που δίνονται στον Πίνακα 3.

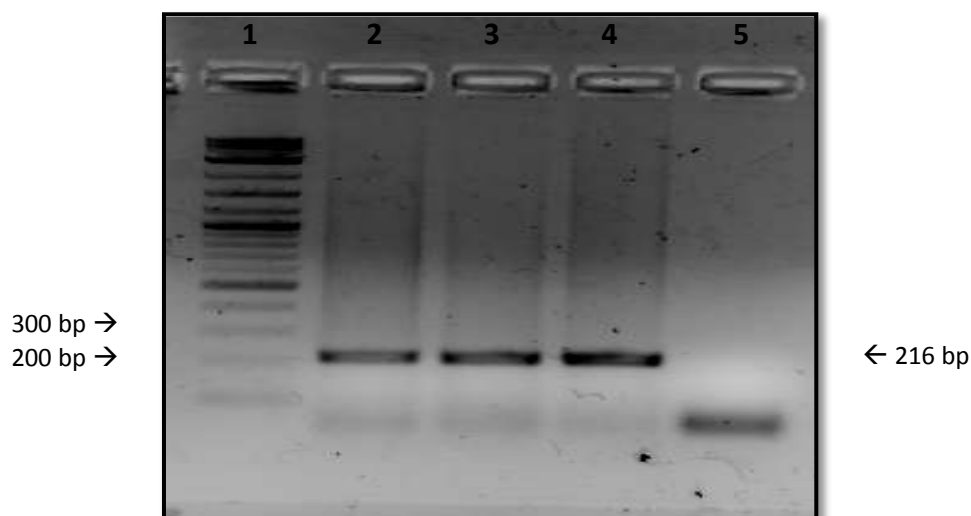
3. Αποτελέσματα

3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA και ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής των γονιδίων BRAF και KRAS με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

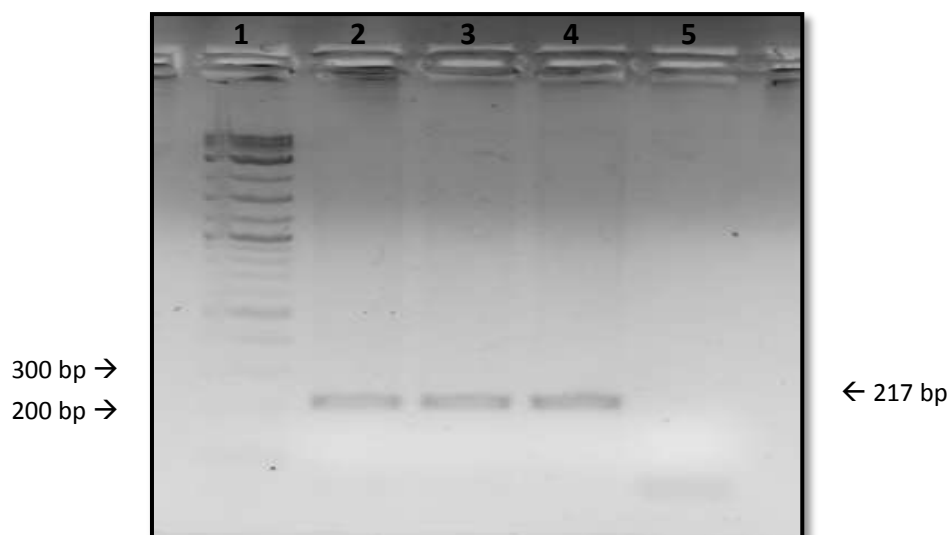
Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τις βιοψίες ιστών ενισχύθηκε με χρήση κατάλληλων εκκινητών στις περιοχές των γονιδίων BRAF (κωδικόνιο 600) και KRAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Στις Εικόνες 15-17 απεικονίζονται ενδεικτικά τα προϊόντα ενίσχυσης με PCR της επιθυμητής περιοχής διαφορετικών δειγμάτων για τις μεταλλάξεις BRAF, KRAS 12/13 και KRAS 61, αντίστοιχα.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). **Διαδρομές 2-3:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 43 και 45. **Διαδρομή 4:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.



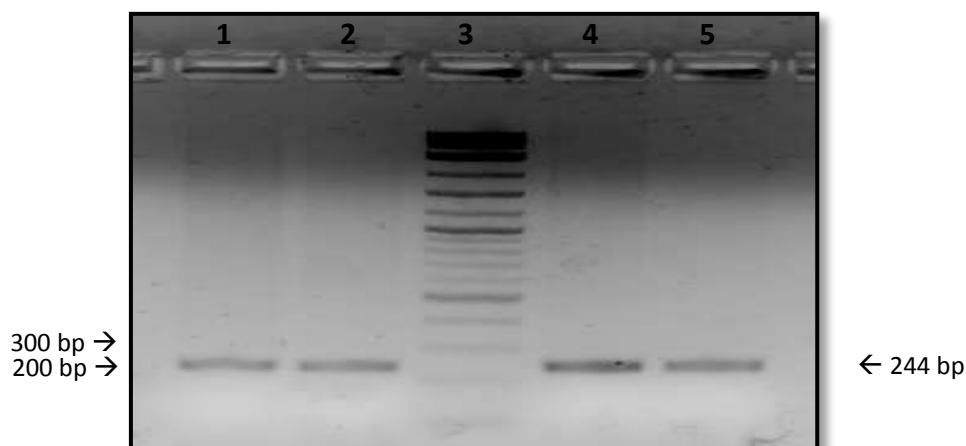
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει τα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου KRAS μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). **Διαδρομές 2-4:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 37, 38 και 39. **Διαδρομή 5:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 του γονιδίου KRAS μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). **Διαδρομές 2-4:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 37, 38 και 39. **Διαδρομή 5:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.

3.2. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

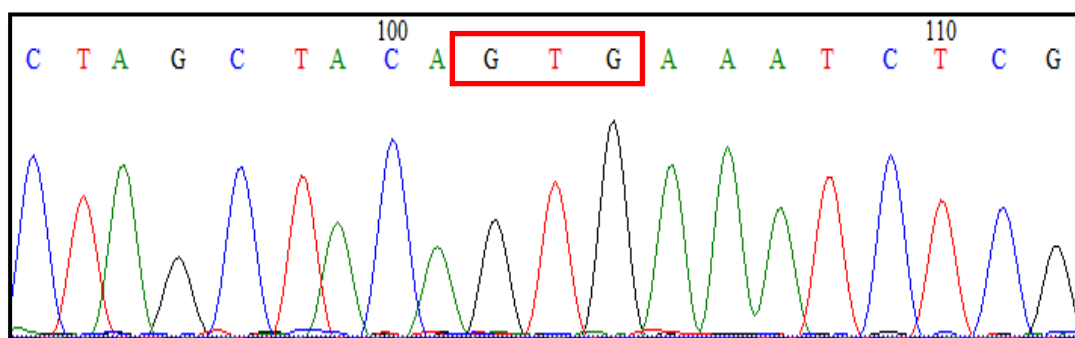
Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος για τον διαχωρισμό της ενισχυμένης γονιδιακής περιοχής από τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης PCR, και ειδικότερα εκκινητές ή διμερή εκκινητών, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη αλληλούχιση για την ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων BRAF και KRAS. Στις *Εικόνες 18-20*, απεικονίζονται ενδεικτικά τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR.



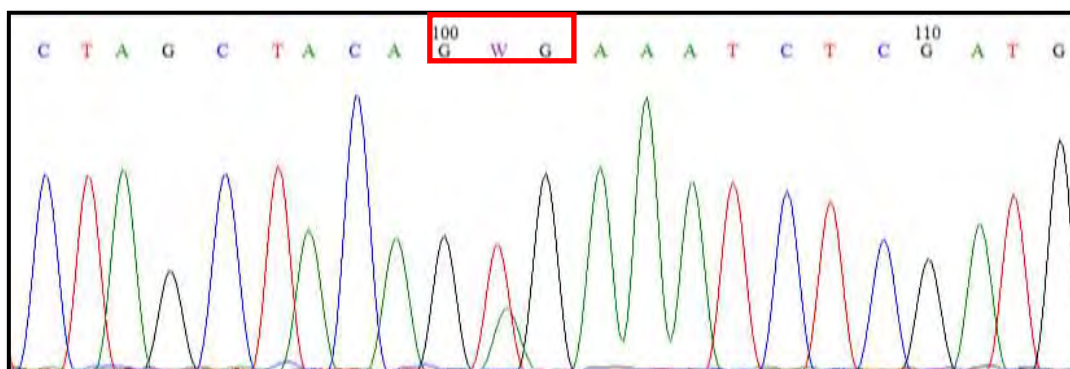
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης της περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 3:** δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). **Διαδρομές 1-2-4-5:** Καθαρισμένα προϊόντα ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων 48, 49, 50 και 51.

3.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

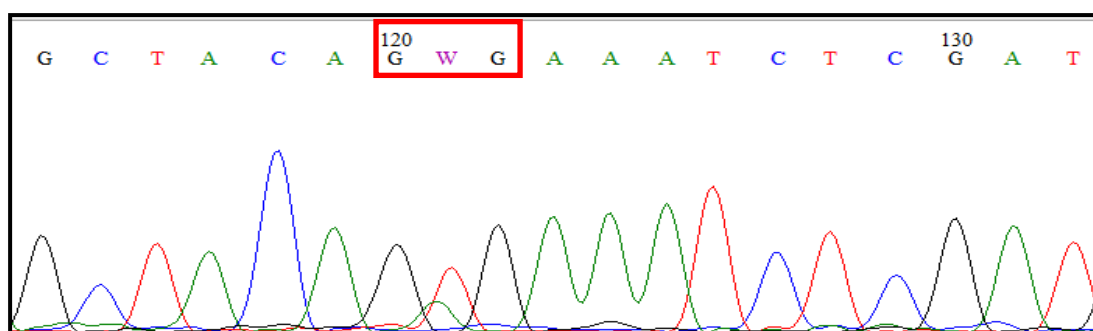
Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR έδωσε 97-100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές των γονιδίων BRAF και KRAS, μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Στις Εικόνες 21-26 δίνονται ενδεικτικά τα χρωματογράφημα που προέκυψαν μετά από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Οι εικόνες εστιάζονται στις περιοχές του γονιδίου BRAF που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 600 (αλληλουχία CTG) και στις περιοχές του γονιδίου KRAS που περιλαμβάνουν τα κωδικόνια 12 (αλληλουχία GGT), 13 (αλληλουχία GGC) και 61 (αλληλουχία CAA).



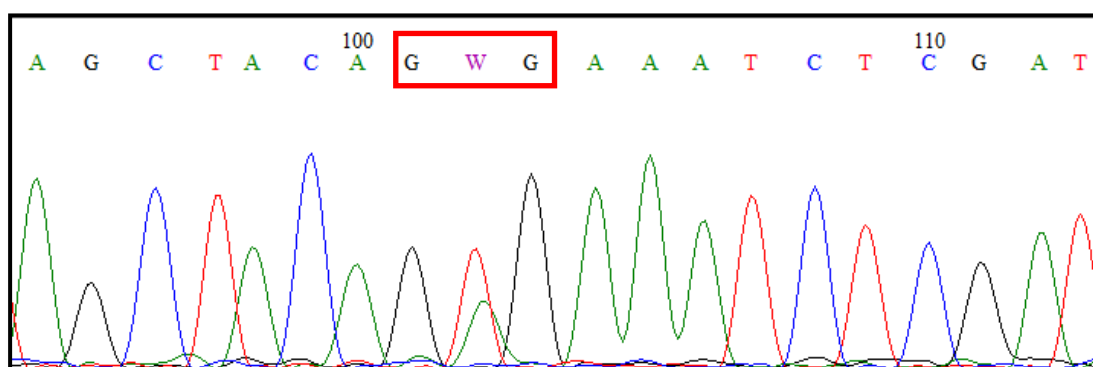
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα περιοχής του γονιδίου BRAF για το δείγμα 34. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του καταλοίπου 600 (η αλληλουχία GTG δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).



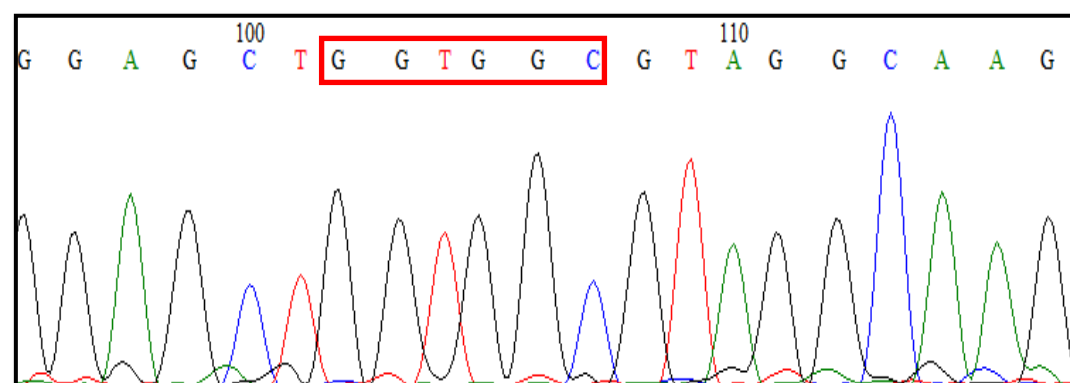
Εικόνα 22 : Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου BRAF για το δείγμα 45. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 600 (η συνύπαρξη GTG και GAG υποδηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία).



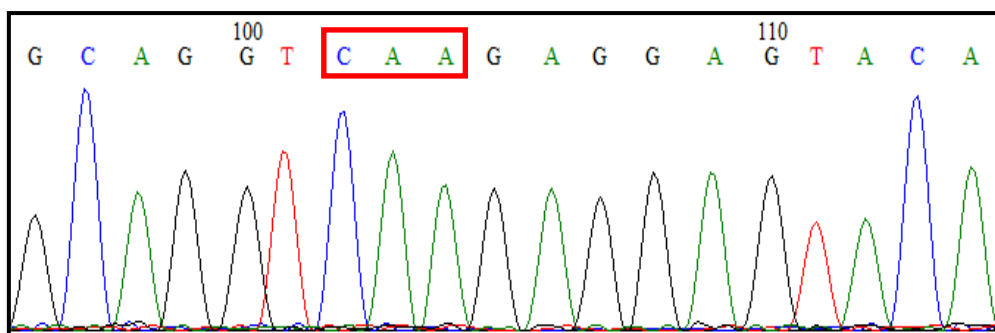
Εικόνα 23 : Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου BRAF για το δείγμα 48. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 600 (η συνύπαρξη GTG και GAG υποδηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία).



Εικόνα 24 : Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου BRAF για το δείγμα 49. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 600 (η συνύπαρξη GTG και GAG υποδηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης σε ετεροζυγωτία).



Εικόνα 25: Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου KRAS για το δείγμα 35. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση των κωδικονίων 12 (η αλληλουχία GGT δηλώνει την απουσία μετάλλαξης) και 13 (η αλληλουχία GGC δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα μιας περιοχής του γονιδίου KRAS για το δείγμα 36. Στο πλαίσιο σημειώνεται η αλληλουχία που συναντάται στη θέση του κωδικονίου 61 (η αλληλουχία CAA δηλώνει την απουσία μετάλλαξης).

Στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF σε 3 από τα 18 δείγματα που μελετήθηκαν. Οι μεταλλάξεις αυτές απαντώνται σε ετεροζυγωτία και αφορούν την αλλαγή του κωδικονίου GTG σε GAG, που συνεπάγεται την αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη (Val, V), σε γλουταμικό (Glu, E). Όσον αφορά στην ανάλυση του γονιδίου KRAS δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί τον πιο κοινό τύπο κακοήθειας του ενδοκρινικού συστήματος και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται με σταθερό ρυθμό σε πολλές χώρες (Nikiforov, 2011). Οι όγκοι του καρκίνου του θυρεοειδούς μπορεί να προέρχονται από τα θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα, από τα παραθυλακιώδη ή κύτταρα C και από μη επιθηλιακά κύτταρα (Scora, 2004). Σύμφωνα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά οι διαφορετικοί τύποι ταξινομούνται σε θηλώδη, θυλακιώδη, μυελοειδή και αναπλαστικά καρκινώματα ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές με την πιο κοινή να είναι ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου, που περιέχει χαρακτηριστικά τόσο του θηλώδους όσο και του θυλακιώδους καρκίνου.

Η κατανόηση της μοριακής παθογένεσης και η ταυτοποίηση μοριακών δεικτών, που θα χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση και την πρόγνωση του θυρεοειδούς καρκίνου, είναι υψίστης κλινικής σημασίας. Προηγούμενες μελέτες αποκάλυψαν πως ορισμένες μεταλλάξεις, ιδιαίτερα αυτές που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης των MAP κινασών (MAPK), συμβάλλουν στην παθογένεση του θυρεοειδούς καρκίνου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως οι μεταλλάξεις αυτές, όταν υπάρχουν, κατά τεκμήριο αποκλείουν την ύπαρξη άλλων μεταλλάξεων, είναι δηλαδή αμοιβαία αποκλειόμενες (mutually exclusive). Αυτές οι μοριακές αλλαγές περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF και στα γονίδια RAS, καθώς και τις γενετικές αναδιατάξεις μεταξύ των RET/PTC και PAX8/PPARγ (Nikiforova et al., 2003b; Nikiforov et al., 2013).

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής μελέτης ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων BRAF και KRAS με τους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον Ελληνικό πληθυσμό. Συνολικά μελετήθηκαν 18 δείγματα από ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, που περιλαμβάνουν 10 θηλώδη, 7 θηλώδη καρκινώματα θυλακιώδους υποτύπου και 1 θυλακιώδες καρκίνωμα. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη, την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών των υπό μελέτη γονιδίων, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές, χρησιμοποιώντας την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ενισχυμένων και καθαρισμένων προϊόντων PCR. Στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF σε 3 από τα 18 δείγματα που μελετήθηκαν. Όλες οι μεταλλάξεις αφορούν την αλλαγή του κωδικονίου GTG σε GAG, που συνεπάγεται την αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη (Val, V) σε γλουταμικό (Glu, E). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε μία συνεχή δραστηριοποίηση της κινάσης BRAF και σε μία χρόνια διέγερση του μονοπατιού των MAP κινασών, δίνοντας γένεση στην ανάπτυξη θυρεοειδικών όγκων (Wan PT, 2004; Knauf JA et al., 2005). Η αλληλούχιση των δειγμάτων έδειξε την παρουσία τόσο του 'αγρίου τύπου' κωδικονίου (GTG), όσο και του μεταλλαγμένου (GAG), γεγονός που οφείλεται στο ότι η βιοψία ιστού που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA που ενισχύθηκε με PCR περιείχε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. Οι μεταλλάξεις

του γονιδίου BRAF βρέθηκαν σε 2 θηλώδη καρκινώματα και σε ένα θηλώδες καρκίνωμα θυλακιδώδους υπότυπου. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία, όσον αφορά στη συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF σε θηλώδη καρκινώματα και σε υποτύπους τους. Η μετάλλαξη BRAF^{V600E} τυπικά εντοπίζεται στον κλασικό θηλώδη καρκίνο (με μια υψηλή συχνότητα περίπου του 50%), αλλά σπανιότερα στο θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιδώδες πρότυπο ανάπτυξης (ποσοστό περίπου 14%) (Adeniran *et al.*, 2006; Xing, 2008). Επιπλέον, η μετάλλαξη BRAF^{V600E} είναι δυνατόν να ανιχνευθεί στα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και στα αναπλαστικά καρκινώματα του θυρεοειδούς. Όσον αφορά στην ανάλυση του γονιδίου KRAS δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Η εργασία αυτή περιλαμβάνει θηλώδη καρκινώματα με θυλακιδώδη υπότυπο για τα οποία έχει αναφερθεί ποσοστό μεταλλάξεων στα γονίδια RAS (HRAS, KRAS, NRAS) μέχρι και 20% (Nikiforova *et al.*, 2003b). Εντούτοις, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν επιτρέπουν την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί η μοναδική, μέχρι στιγμής, έρευνα που διεξήχθη στον ελληνικό πληθυσμό και είχε ως αντικείμενο την συσχέτιση μεταλλάξεων BRAF και KRAS σε δείγματα θηλώδους και μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς (Goutas *et al.*, 2008). Στη μελέτη αυτή, μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του KRAS βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό, τόσο σε θηλώδη (54,5%), όσο και σε μυελοειδή (40,9%) καρκινώματα. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη η μετάλλαξη BRAF^{V600E} ανιχνεύτηκε σε μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με την μετάλλαξη του KRAS σε θηλώδη καρκινώματα (27,3%). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα τμήμα μιας ευρύτερης μελέτης που αφορά στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων που σχετίζονται με όλους τους διαφορετικούς τύπους του καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό. Με βάση το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, είναι απαραίτητο η μελέτη αυτή να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και να περιλαμβάνει την ανάλυση επιπρόσθετων μεταλλάξεων στα γονίδια BRAF και RAS (κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων HRAS και NRAS), καθώς και πιθανών χρωμοσωμικών αναδιατάξεων (RET/PTC και PAX8/PPARγ αντίστοιχα).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adeniran, A. J. , Z. Zhu , M. Gandhi , et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006. 30 (2):216–222.
- Baloch ZW, LiVolsi VA 2002 Pathology of thyroid gland In: VA LiVolsi, SL Asa (eds), Endocrine Pathology, Churchill Livingstone, New York, pp, 61-101.
- Carcangiu ML, Bianchi S, Savino D, Voynick IM, Rosai J, 1991 Follicular Hürthle cell tumors of the thyroid. *Cancer* 68: 1944-1953.
- Castro, P. , A. P. Rebocho , R. J. Soares , et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006. 91 (1):213–220.
- Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., Lowy, D. R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kristen murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 79(16): 4848-4852.
- Ciampi, R. and Y. E. Nikiforov . Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005. 16 (3):163–172.
- Cohen, Y. , M. Xing , E. Mambo , et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003. 95 (8):625–627.
- Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R., Kloos, R. T., LEE, S. L., Mandel, S. J., Mazzaferri, E. L., McIver, B., Pacini, F., Schlumberger, M., Sherman, S. I., Steward, D.L., Tuttle, R. M., American Thyroid Association (ata) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 19(11): 1167-1214.
- Davies Louise, Welch H. Gilbert (May 2010). Increasing Incidence of Thyroid Cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 295(18):2164-7.
- Dwight, T. , S. R. Thoppe , T. Foukakis , et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003. 88 (9):4440–4445.
- Fallahi, P., Giannini, R., Miccoli, P., Antonelli, A., Basolo, F. (2014). Molecular diagnostics of fine-needle aspiration for the presurgical screening of thyroid nodules. *Current Genomics*, 15: 171-177.
- Fawcett, D., Jensch, R. (2002). Bloom & Fawcett's Concise Histology. Arnold Publishers, New York, pp. 257-258.
- French, C. A. , E. K. Alexander , E. S. Cibas , et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 2003. 162 (4):1053–1060.
- Grieco, M. , M. Santoro , M. T. Berlingieri , et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990. 60 (4):557–563.

- Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D., Bouka, M., Lazaris, A. C., Nasioulas, G., Gazouli, M. (2008). BRAF and K-RAS Mutation in a Greek Papillary and Medullary Thyroid Carcinoma Cohort. *Anticancer Research*, 28: 305-308.
- Haigh Philip I. . (2000). Anaplastic Thyroid Carcinoma. Current Treatment Options in Oncology Volume 1, Issue 4, pp 353-357.
- Hall, A., Marshall, C. J., Spurr, N. K., Weiss, R. A. (1983). Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the RAS gene family located on chromosome 1. *Nature*, 303(5916): 396-400.
- Hedinger C, Williams ED, Sobin LH, 1989 The WHO histological classification of thyroid tumors: A commentary on the second edition. *Cancer* 63: 908-911.
- Hundahl, S. A. , I. D. Fleming , A. M. Fremgen , and H. R. Menck . A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985–1995 [comment in: *Cancer*. 1998;83(12):2434–2436]. *Cancer* 1998. 83 (12):2638–2648.
- Kebebew Electron, ND, Weng Julie, BS, Bauer Juergen, MD, Ranvier Gustavo, MD, Clark Orlo H., MD, Duh Quan-Yang, MD, Shibru Daniel, MD, Bastian Boris, MD, and Griffin Ann, PhD. (2007). The Prevalence and Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *Annals of Surgery* 246(3):466-70; discussion 470-1.
- Kimura, E. T. , M. N. Nikiforova , Z. Zhu , J. A. Knauf , Y. E. Nikiforov , and J. A. Fagin . High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003. 63 (7):1454–1457.
- Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2012; 118:1764–1773. [PubMed: 21882184].
- Knauf, J. A. , X. Ma , E. P. Smith , et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 2005. 65 (10):4238–4245.
- Kroll, T. G. , P. Sarraf , L. Pecciarini , et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000. 289 (5483):1357–1360.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*, 62(e3923): 1-5.
- LiVolsi VA 1990 Surgical Pathology of the Thyroid In: Bennington JL (ed) Major Problems in Pathology, vol. 22, WB Saunders Co, Philadelphia.
- Leboulleux Sophie , Baudin Eric , Travagli Jean-Paul and Schlumberger Martin. (2004). Medullary Thyroid Carcinoma. *Clinical Endocrinology* 61, 299–310.
- Liebner, A. D., Shah, H. M. (2011). Thyroid cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2(5): 173-195.
- Lindsey Enewold, Kangmin Zhu, Elaine Ron, Aizen J. Marrogi, Alexander Stojadinovic, George E. Peoples and Susan S. Devesa (2009). Rising Thyroid Cancer Incidence in the United States by Demographic and Tumor Characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 18; 784.

- Liska, J., Altanerova, V., Galbavy, Š., Stvrtiina, S., Brtko, J. (2005). Thyroid tumors: Histological Classification and Genetic Factors Involved in the Development of Thyroid Cancer. *Endocrine Regulations*, 39: 73-83.
- Liu Z, Hou P, Ji M, et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:3106–3116. [PubMed: 18492751]
- Liu, J. , B. Singh , G. Tallini , et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer* 2006. 107 (6):1255–1264.
- Marshall, C. J., Hall, A., Weiss, R. A. (1982). A transforming gene present in human sarcoma cell lines. *Nature*, 299(5879): 171-173.
- Marques, A. R. , C. Espadinha , A. L. Catarino , et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002. 87 (8):3947–3952.
- Mendoza, M. C., Er, E. E., Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways : cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*, 36: 320-328.
- Namba, H. , S. A. Rubin , and J. A. Fagin . Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1990. 4 (10):1474–1479.
- Neff Ryan L., Farrar William B., Kloos Richard T., Burman Kenneth D. (2008). Anaplastic Thyroid Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* Pages 525–538.
- Nikiforova, M. N. , P. W. Biddinger , C. M. Caudill , T. G. Kroll , and Y. E. Nikiforov . PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002. 26 (8):1016–1023.
- Nikifrova Marina N., Kimura Edna T., Zhu Zhaowen, Knauf Jeffrey A., Nikiforov Yuri E., and Fag James A. . (2003). High Prevalence of BRAF Mutations in Thyroid Cancer. Genetic Evidence for Constitutive Activation of the RET/PTC-RAS-BRAF Signaling Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Research* 63; 1454.
- Nikiforova, M. N. , R. A. Lynch , P. W. Biddinger , et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003. 88 (5):2318–2326.
- Nikiforova, M. N., Lynch, R. A., Biddinger, P. W., Alexander, E. K., Dorn 2nd, G. W., Tallini, G., Kroll, T. G., Nikiforov, Y. E. (2003b). RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(5): 2318-2326.
- Nikiforov, Y. E., Yip, L., Nikiforova, M. N. (2013). New strategies in diagnosing cancer in thyroid nodules: impact of molecular markers. *Clin Cancer Res*, 19(9): 2283-2288.
- Nikiforov, Y. E. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2002. 13 (1):3–16.
- Nikiforov, Y. E. (2011). Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 135: 569-577.

- Nikiforov Y. E. , Biddinger Paul W., Thompon Lester D.R. (2012), Second Edition. Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. pp. 155.
- Nikiforov Y. E. & Nikiforova Marina N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology* 10.1038/nrendo.2011.142.
- Pappoti M, Torchio B, Grassi L, Favero A, Bussolati G, 1996 Poorly differentiated oxyphilic (Hürthle cell) carcinomas of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 20: 686-694.
- Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA, 1992 Tumors of the Thyroid Gland. Atlas of Tumor Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-491.
- Santoro, M. , N. A. Dathan , M. T. Berlingieri , et al. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RETproto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 1994. 9 (2):509–516.
- Scopa, D. C. (2004). Histopathology of thyroid tumors. An Overview. *Hormones*, 3(2): 100-110.
- Sundaram Meera V. (2006). RTK/Ras/MAPK signaling. *Wormbook* 11:1-19.
- Tufano RP, Bishop J, Wu G. Reoperative central compartment dissection for patients with recurrent/persistent papillary thyroid cancer: efficacy, safety, and the association of the BRAF mutation. *Laryngoscope*. 2012; 122:1634–1640. [PubMed: 22549559].
- Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., Tsakopoulos, M. (2001a). Human Physiology: The mechanisms of body function. Vol. I, 8th ed., McGraw-Hill Higher Education, pp. 374-377, 388-392.
- Vasko, V. V. , J. Gaudart , C. Allasia , et al. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2004. 151 (6):779–786.
- Wan, P. T. , M. J. Garnett , S. M. Roe , et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004. 116 (6):855–867.
- Watson, J. D., Caudy, A. A., Myers, R. M., Witkowski, J. A. (2007). Recombinant DNA (Genes and Genomes – a short course). W. H. Freeman and Company, New York and Basingstoke, 3rd edition, pp. 103, 126-135.
- Xing Mingzhao. (2013). Molecular Pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature reviews. Cancer*. 184-99. doi: 10.1038/nrc3431.
- Xing, Mingzhao. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005. 12 (2):245–262.
- Xing Mingzhao. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13:184–199. [PubMed: 23429735].
- Xinh Mingzhao, Haugen Bryan R, Schlumberger Martin. (2013). Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet* 2013; 381: 1058–69.

Xing Mingzhao, Westra William H., Tufano Ralph R., Cohen Yoram, Rosenbaum Eli, Rhoden Kerry J., Carson Kathryn A., Vasko Vasily, Larin Alexandr, Tallini Giovanni, Tolaney Sara, Holt Elizabeth H., Hui Pei, Umbricht Christopher B., Basaria Shehzad, Ewertz Marge, Tufano Anthony P., Califano Joseph A., Ringel Matthew D., Zeiger Martha A., Sidransky David and Ladenson Paul W. (2005). BRAF Mutation Predicts a Poorer Clinical Prognosis for Papillary Thyroid Cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(12):6373-9.

Zhu, Z. , M. Gandhi , M. N. Nikiforova , A. H. Fischer , and Y. E. Nikiforov . Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma: an unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 2003. 120 (1):71–77.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Πλαγεράς, Π., Γεροβασίλη, Α., Παπαϊωάννου, Α. (2012). Εφαρμογές Μοριακής Διαγνωστικής. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης , Broken Hill Publishers Ltd, pp. 185-194, 247-252, 254-256.

Σμοκοβίτης Αθανάσιος (2007), ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε. pp. 376-377,380,382,384,386.

Ι. Γ. Γεωργιάτσου, Θ.Γ Γιαννακούρου (2005). Έλεγχος Μεταβολισμού στο μοριακό επίπεδο, Εκδόσεις Γιαχούδη.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Παθήσεις Θυρεοειδούς Αδένα, Βασίλης Ι. Λαγόπουλος, Χειρουργός, Γενική και Λαμπαροσκοπική Χειρουργική – Χειρουργική Ογκολογία, Μητροπόλεως 51, 54623 Θεσσαλονίκη. τ: 2315 007585 κ:6944710934 (Available from: <http://www.surgical-treatment.gr/Surgicaldiseases/Thyroid/>)

BMJ Best Practice, Thyroid function testing (Available from: <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/1121.html>)

C:/Documents and Settings/USER/Desktop/BioWebS. Διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης . (Available from: <http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab8-Biol210.htm>)

Gel Electrophoresis. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (Available from: <http://wec4life.wikispaces.com/Gel+Electrophoresis>)

PathologyOutlines.com. Thyroid gland. Other carcinoma. Follicular carcinoma. (Available from: <http://pathologyoutlines.com/topic/thyroidfollicular.html>)

PAPANIKOLAOU SOCIETY OF CYTOPATHOLOGY. Medullary Thyroid Cancer. (Available from: <http://www.papsociety.org/atlas/displayimage.php?album=46&pos=11>)

PATHPEDIA , A unifying concept in pathology. Create, Communicate, Collaborate. Papillary carcinoma (Available from:

http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/thyroid_gland/papillary_carcinoma.aspx)

SEER - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. (2015). SEER Stat Fact Statistics: Thyroid Cancer, Review 1975-2009. National Cancer Institute. Bethesda (MD). (Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>)

Surgical Pathology Atlas. Anaplastic Carcinoma of the Thyroid. (Available from : <http://www.surgicalpathologyatlas.com/glfusion/mediagallery/media.php?s=20080802165939445>)